CAROLINA BOSSO ANDRÉ

"INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SISTEMAS ADESIVOS"

PIRACICABA
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CAROLINA BOSSO ANDRÉ

"INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E MICROBIOLÓGICAS DE SISTEMAS ADESIVOS"

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giannini

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA A FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE DENTÍSTICA.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluna Carolina Bosso André, e orientado pelo Prof. Dr. Marcelo Giannini.

Assinatura do Orientador

_____

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

André, Carolina Bosso, 1987-
An25i Influência da incorporação de antimicrobianos nas propriedades mecânicas e microbiológicas de sistemas adesivos / Carolina Bosso André. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Giannini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Bactérias. 2. Adesão. 3. Dentina. I. Giannini, Marcelo, 1969- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Influence of the antimicrobial addition on mechanical and microbiology properties of adhesive systems
Palavras-chave em Inglês:
Bacterias
Adhesion
Dentin
Área de concentração: Dentística
Titulação: Mestra em Clínica Odontológica
Banca examinadora:
Marcelo Giannini [Orientador]
Caio Cézar Randi Ferraz
Evelise Machado de Souza
Data da defesa: 19-02-2013
Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata CAROLINA BOSSO ANDRÉ aprovada.

Prof. Dr. MARCELO GIANNINI

Profa. Dra. EVELISE MACHADO DE SOUZA

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Maria de Fátima** e **Amaury** pelo exemplo de vida, apoio incondicional durante todos esses anos e por não pouparem esforços na minha formação educacional e profissional.

Ao meu irmão **Amaury** pela eterna amizade e lealdade, força e apoio em todas as minhas decisões.

A **Deus** por iluminar o meu caminho e me amparar nesta jornada, minha eterna fé.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcelo Giannini**, pelo exemplo de dedicação, profissionalismo, competência, seriedade e honestidade. Obrigada por toda orientação, por todas as oportunidades oferecidas, por todos os ensinamentos transmitidos e toda confiança em mim depositada. Obrigada ainda pela amizade.

As minhas amigas **Ana Paula Almeida Ayres** e **Patricia Makishi**, por todo companheirismo, por todos os momentos de apoio e força, por toda ajuda na realização dessa dissertação e, principalmente, pela grande amizade.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do Reitor **Fernando Ferreira Costa**;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), na pessoa do diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior** e do diretor associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** pela oportunidade de realização do curso de Pós-graduação;

À coordenadora geral dos cursos de Pós-graduação da FOP-UNICAMP **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia** e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp**, pela bolsa de estudo concedida durante os dois anos de mestrado (processo 2010/13599-0) e pela bolsa auxílio concedida para a realização desse projeto (processo 2011/ 17841-2);

Aos Professores do curso de Mestrado, Área de Dentística, **Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron**, **Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar**, **Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins**, **Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo**, **Prof. Dr. José Roberto Lovadino** e **Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima** pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional;

Ao **Prof. Dr. Daniel Chan** (University of Washington School of Dentistry) pela

colaboração nesta pesquisa;

À Profa. **Dra. Brenda Paula Figueiredo A. Gomes**, pela co-orientação e colaboração no desenvolvimento dessa pesquisa;

À **Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, pela atenção prestada e realização das análises estatísticas;

Aos Professores que estiveram presentes na banca de exame de qualificação, **Profa. Dra. Maria Cecília Caldas Giorgi**, **Profa. Dra. Vanessa Cavalli** e **Profa. Dra. Andréia** Bolzan de Paula, pela valiosa contribuição à este trabalho;

À aluna de mestrado da Área de Endondontia, **Thais Majeste** por toda ajuda, apoio e colaboração no desenvolvimento dessa pesquisa. Obrigada por sempre estar disposta e sempre me atender quando precisei;

Ao **Departamento de Materiais Dentários** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP por ter permitido a utilização da Máquina de Ensaios Universal;

À **Área de Endodontia** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP por ter permitido a utilização do laboratório e equipamentos;

À Área de **Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, em especial ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen** por ter permitido a utilização de alguns equipamentos;

À Área de **Microbiologia e Imunologia** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, em especial à Profa. Dra. **Renata de Oliveira Mattos Graner** e ao **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp** por ter permitido a utilização da

câmara de anaerobiose, pelo fornecimento de algumas bactérias e pela colaboração;

Aos funcionários do centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da FOP-UNICAMP, **Adriano L. Martins** e **Eliene Orsini N. Romani**, pelo apoio e atenção prestada;

Aos funcionários da Área de Dentística, **Mônica**, e da Área de Materiais Dentários, **Marcos Cangiani** e **Selma Segalla**, pela atenção e disposição em ajudar sempre quando solicitados;

À todos os colegas de mestrado, **Ana Paula**, **Erick**, **Dayane**, **Maria do Carmo**, **Alan**, **Kamila**, **Juliana**, **Núbia** e **Henrique**;

Aos amigos **Valéria**, **Pedro**, **Klíssia, Dayane, Marcela e Rafael**, pela amizade, conselhos e pelos muitos momentos de descontração;

À aluna de doutorado da Área de Farmacologia, **Lívia Galvão** por toda ajuda no desenvolvimeto dessa pesquisa, pela amizade e companheirismo;

Agradeço, especialmente, às amigas de república, **Camila Batista** e **Priscila Campioni** por terem tornado esses dois anos em Piracicaba muito mais agradáveis e por se tornarem minha segunda família;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

More the knowledge lesser the ego,

lesser the knowledge more the ego.

Albert Einstein

RESUMO

A evolução dos sistemas adesivos tem proporcionado melhora significativa na qualidade do selamento marginal e na durabilidade das restaurações. Alguns deles apresentam, além dos monômeros, solventes e iniciadores, componentes como fluoretos, partículas de carga e agentes antibacterianos, os quais tem sido pouco estudados. Este estudo avaliou a morfologia e a resistência de união resina-dentina e a atividade antimicrobiana de 3 sistemas adesivos (Gluma 2Bond, Clearfil SE Protect e Peak Universal Bond) e atividade antimicrobiana de 6 sistemas adesivos e grupos controles. No estudo de resistência da união dentina-restauração foi utilizada a dentina humana coronária da superfície oclusal (30 terceiros molares). Os adesivos foram aplicados de acordo com as recomendações do fabricante. Um bloco de resina composta (6 mm de altura) foi construído incrementalmente após a aplicação do adesivo, em seguida, os dentes foram seccionados para a obtenção dos espécimes para microtração. O ensaio de microtração foi realizado 24 horas após a confecção das restaurações ou após 1 ano de armazenamento delas em saliva artificial. Os dados de microtração foram submetidos à análise de variância (2 fatores) e teste de Tukey 2 fatores ($\alpha = 5\%$). Para a análise da morfologia da área de união, os terceiros molares (n=6) foram preparados de modo semelhante ao estudo de microtração, entretanto seccionados apenas no sentido mésio-distal para possibilitar a visualização da área de união. Na avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas 4 espécies bacterianas facultativas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*,

Lactobacillus casei e *Streptococcus mutans*. As análises envolveram os métodos de halo de inibição e atividade bactericida por contato, que foram determinadas para todas as amostras bacterianas. Não houve diferença estatística na resistência de união entre os adesivos Gluma 2Bond e Peak Universal Bond. O Clearfil SE Protect apresentou a menor média de resistência de união. Os adesivos não apresentaram redução na resistência de união após um ano de armazenamento. Todos os adesivos formaram camada híbrida e *tags* resinosos no interior dos túbulos dentinários, cuja espessura e quantidade, respectivamente, variaram dependendo do adesivo utilizado. Na análise dos dados do halo de inibição foram empregados os testes de Kruskal Wallis e Dunn ($\alpha = 5\%$). Na avaliação da atividade antimicrobiana somente o Gluma 2Bond não apresentou halo de inibição, porém foi bactericida após 24 horas de contato com o inóculo para todas as bactérias testadas. O Clearfil SE Protect apresentou halo de inibição, assim como o seu *primer* sozinho, e foi bactericida para todas as bactérias testadas em tempos específicos de contato com o inóculo. O adesivo Peak Universal Bond apresentou halo de inibição, quando fotopolimerizado, para apenas duas bactérias, e não foi bactericida em nenhum dos tempos testados para todas as bactérias.

Os resultados sugerem que o adesivo autocondicionante teve menor resistência de união quando comparado ao Peak Universal Bond, entretanto não foi observado redução da resistência de união após armazenamento por um ano para nenhum dos adesivos avaliados. O condicionamento com ácido fosfórico induz a formação de camada híbrida mais espessa e formação de grande quantidade de

tags de resina quando comparado aos adesivos autocondicionantes. O Gluma 2Bond e o Clearfil SE Protect apresentam potencial bactericida, no entanto apenas o Clearfil SE Protect e o Peak Universal Bond apresentaram potencial inibitório.

ABSTRACT

The evolution of adhesive systems have produced significant improvement in marginal sealing ability and durability of dental restorations. Besides the monomers, solvents and initiators found in the adhesive systems, components such as, fluorides, fillers and antibacterial agents may also be found, however there is still a lack of studies about their role. This study evaluated the morphology, the dentin bond strength and the antibacterial activity of three different adhesive systems (Gluma 2Bond, Clearfil SE Protect and Peak Universal Bond). Human coronal, occlusal dentin was used for bonding and the adhesives were used according to the manufacturer's instructions. A composite block was incrementaly built-up on dentin after adhesive application. Afterwards, teeth were sectioned for obtaining microtensile specimens. For resin-dentin bonded morphology, the teeth were prepared similary to the bond strength test methodology. However, teeth were sectioned in only one direction (mesio-distal) to analyze the dentin-resin interface. Microtensile Bond strength test was performed after 24 hours or 1 year after storage in artificial saliva at 37^{o}C. Microtensile data were analyzed by 2-way ANOVA and Tukey test. All adhesives formed hybrid layer and resin tags, which varied in thickness and number, respectively, according to the type of material used. In the antimicrobial activity test, 4 facultative bacteria were used: *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans*. Inhibition Halo and Minimum Bactericidal Concentration were performed for all the bacterial samples. For halo inhibition data were

analyzed by Dunn and Kruskal Wallis tests. There was no statistical difference in bond strength between the Gluma 2Bond and Peak Universal Bond adhesives. The Clearfil SE Protect showed the lowest bond strength to dentin. Adhesives showed no reduction in bond strength after one year of storage in human saliva. In the evaluation of the antimicrobial activity only Gluma 2Bond showed no inhibition halo, but was bactericidal after 24 hours of contact with the inoculum for all bacteria tested. The Cleafil SE Protect presented inhibition halo, as well as his primer, and was bactericidal against all bacterial strains tested at specific times of contact with the inoculum. The adhesive Peak Universal Bond showed inhibition halo, when cured, to only two bacteria, and was not bactericidal at any of the times, for all tested bacteria.

Results suggested that the self-etching adhesive showed the lowest bond strength mean compared to Peak Universal Bond, however the dentin bond strength of all the adhesive systems remained stable after the storage for one year. The phosphoric acid caused the formation of a thicker hybrid layer and higher amount of resin tags when compared to the self-etching adhesives. Gluma 2Bond and Clearfil SE Protect exhibit bactericidal potential. The Clearfil SE Protect and Peak Universal Bond also demonstrated inhibitory potential.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **1**

2 REVISÃO DA LITERATURA **5**

3 PROPOSIÇÃO **14**

4 MATERIAL E MÉTODOS **15**
4.1 Delineamento Experimental 15
4.2 Resistência de União (Teste de Microtração) 18
4.3 Análise do Padrão de Fratura dos Espécimes Testados (em MEV) 21
4.4 Análise da Área de União Dentina-Sistema Adesivo (em MEV) 23
4.5 Halo de Inibição 26
4.2 Determinação da Atividade Bactericida por Contato 31

5 RESULTADOS **36**
5.1 Resistência de União 36
5.2 Análise do Padrão de Fratura dos Espécimes Testados (em MEV) 37
5.3 Análise da Área de União Dentina-Sistema Adesivo (em MEV) 45
5.4 Halo de Inibição 47
5.5 Determinação da Atividade Bactericida por Contato 54

6 DISCUSSÃO **58**

7 CONCLUSÃO **69**

REFERÊNCIAS **70**

ANEXO 1 **80**

ANEXO 2 **81**

1. INTRODUÇÃO

Buonocore, em 1955, descreveu a técnica do condicionamento ácido do esmalte, relatando um aumento da resistência de união entre a resina acrílica e o esmalte dental. O tratamento com ácido fosfórico produziu microporosidades nessa superfície, tornando-a mais receptiva à penetração da resina (Buonocore, 1955). Do aperfeiçoamento daquela técnica derivou-se o condicionamento simultâneo do esmalte e da dentina, também chamada de "técnica do condicionamento total" (Bertolotti, 1991 e Fusayama, 1992). A partir disso, os sistemas adesivos sofreram modificações para atuar numa dentina condicionada com ácido fosfórico, pois ao contrário do esmalte, a dentina apresentava-se com redução da energia de superfície e fibrilas colágenas em meio úmido (Nakabayashi *et al.*, 1991; Swift Jr *et al.*, 1997; Van Meerbeek *et al.*, 1998; Giannini *et al.*, 2008).

Os adesivos autocondicionantes dispensam a técnica do condicionamento com ácido fosfórico da dentina, a remoção do ácido com água e o controle da umidade da superfície pós-condicionamento. Esses adesivos dissolvem parcialmente o conteúdo mineral da dentina e infiltram-se no substrato, hibridizando o mesmo. As vantagens são a simplificação da técnica de aplicação do adesivo e a redução da taxa de sensibilidade dental pós-operatória (Van Meerbeek *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2007).

Independente do tipo de adesivo, eles tem a função de formar uma união efetiva e duradoura, selando o substrato. Sabe-se que falhas na união provocadas

pela contração de polimerização ou pela degradação dos adesivos levam à formação de fendas marginais (Carvalho *et al.,* 1996; Meira *et al*., 2007). Dependendo das condições orais, como a presença de biofilme e consumo de açúcares fermentáveis, pode-se iniciar uma lesão recorrente (Bowen & Pearson, 1992; Lingström *et al*., 2000) a partir da parede cavitária. As cáries secundárias são a maior causa de substituição de restaurações (Kidd, 2001).

A união aos tecidos dentais e a sua durabilidade, que garantem o selamento do substrato são relacionadas basicamente aos monômeros resinosos infiltrados e polimerizados nos tecidos dentais. Além desses monômeros resinosos, outros componentes, como fluoretos, brometo (no monômero MDPB), glutaraldeído e clorexidina podem estar presentes na composição dos adesivos e estão indiretamente relacionados à maior durabilidade da união (Van Landuyt *et al*., 2007, Pinto *et al*., 2009; Pinto *et al*., 2010). Alguns desses componentes possuem potencial antimicrobiano e são importantes nas diversas áreas da Odontologia, como a Cariologia, Dentística Restauradora, Periodontia e Endodontia.

Os fluoretos são encontrados em muitos sistemas adesivos, enquanto que, o brometo está exclusivamente presente junto ao monômero 12-metacriloiloxidodecilpiridínio brometo (MDPB) (Shinohara *et al*., 2006; Pinto *et al*., 2010). A introdução do flúor está relacionada com a importância desse componente durante os processos de desmineralização e remineralização (Featherstone *et al.,* 1986; Pinto *et al*., 2009), entretanto, também tem sido considerado um elemento com potencial antibacteriano (Shinohara *et al*., 2006). O

radical brometo foi inserido na molécula do monômero do adesivo com a finalidade de atuar como componente antibacteriano. Este efeito antibacteriano ocorre através da desinfecção da cavidade e da inativação da bactéria (Imazato *et al*., 1994; Imazato *et al.*, 2001; Imazato, 2003; Imazato *et al.*, 2006).

O glutaraldeído é encontrado em alguns adesivos (Gluma/Heraeus, Syntac/Vivadent e ProBond/Dentsply) numa concentração não maior que 5%. Ele tem forte atividade antibacteriana e é também utilizado como agente dessensibilizante (Felton *et al.*, 1898; Schupbach *et al*., 1997; Meiers & Miller, 1996; Imazato, 2003; Arrais *et al.*, 2004). O digluconato de clorexidina tem sido indicado como agente de limpeza cavitária e como inibidor de enzimas que degradam o conteúdo orgânico da dentina. Esse componente pode estar presente na composição do adesivo ou utilizado no pós-condicionamento ácido e previamente à aplicação do adesivo (Perdigão *et al.*, 1994; Carrilho *et al.*, 2007; Breschi *et al.*, 2010; Hiraishi *et al.*, 2009; Hiraishi *et al.*, 2010a; Hiraishi *et al.*, 2010b). A clorexidina tem sido utilizada na terapia Endodôntica e na Periodontia, com função antibacteriana. Na Endodontia é utilizada no preparo biomecânico dos canais radiculares, como solução irrigadora e na fase de medicação intracanal (Sena *et al.*, 2006; Ferraz *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2009), enquanto na Periodontia é usado no controle químico do biofilme dental (McKenzie *et al.*, 1992; Pannuti *et al.*, 2003).

A incorporação de agentes antimicrobianos parece trazer benefícios aos procedimentos restauradores (Shinohara *et al.*, 2006; Carrilho *et al.*, 2007). Entretanto, pouco se sabe sobre possíveis interferências nas propriedades físicas

dos sistemas adesivos e se mesmo após a polimerização, esse efeito antimicrobiano continuaria atuando. Além disso, por estarem presentes numa formulação que contem monômeros adesivos e outros componentes, existe falta de informações a respeito da atividade antimicrobiana dessas composições dos adesivos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os adesivos contemporâneos podem ser classificados como sendo de um, dois ou três passos clínicos, ou ainda de acordo com a sua estratégia de adesão: condicionamento "total" (condicionamento prévio ou separado) ou autocondicionante (Van Meerbeek *et. al.,* 2003). Essa divisão ocorreu em função da evolução dos adesivos dentinários. A principal evolução significativa se deu com Buonocore, em 1955, que revolucionou a Odontologia Restauradora com o condicionamento do esmalte com ácido fosfórico a 80%, promovendo uma maior adesão da resina acrílica por embricamento mecânico dos monômeros nas porosidades criadas pelo ataque ácido.

Os adesivos dentinários, chamados de primeira e segunda geração (entre 1960 e 1970), tinham como conceito principal a união química à dentina e à *smear layer* (lama dentinária). Porém, essa união não foi efetiva, pois apresentava baixa resistência de união e hoje não são mais encontrados no mercado.

Outro grande marco da Odontologia Adesiva foi quando Fusayama *et al.*, em 1979, sugeriu o condicionamento ácido da dentina, com remoção integral da lama dentinária e abertura da embocadura dos túbulos dentinários. Isso possibilitou, segundo Nakabayashi *et al.,* em 1982, a infiltração da resina adesiva entre as fibrilas de colágeno (formação da camada híbrida) e nos túbulos dentinários formando os "tags" de resina.

Os adesivos de condicionamento total podem ser de dois ou três passos. Os de três passos clínicos constituem em: condicionamento com ácido fosfórico,

aplicação de um *primer* hidrófilo e por fim, de uma resina hidrófoba. Já os de dois passos, o *primer* e a resina se encontram em um único frasco. Os adesivos autocondicionantes podem ser de dois ou somente um passo, sendo que os de dois passos possuem um *primer* ácido e uma resina adesiva mais hidrófoba. Já nos passo único existe uma combinação de todos os componentes na solução adesiva (Arrais & Giannini, 2002, De Munck *et al.,* 2005, Sarr *et al.,* 2010, Van Landuyt et al., 2007).

Os sistemas de condicionamento total requerem alguns passos, dentre eles estão o condicionamento, a lavagem e a aplicação de um *primer*, afim de permitir a permeação entre as fibrilas colágenas pelos monômeros e assim formar a chamada camada híbrida. A desmineralização da dentina intertubular e a manutenção da porosidade interfibrilar é necessária para a penetração do monômero na dentina (Nakabayashi *et al.,* 1992, Reis *et al.,* 2005, Albaladejo *et al.,* 2010).

A partir dos estudos de Nakabayashi em 1992, duas estruturas passaram a ser descritas constantemente nos estudos que avaliam a morfologia da área de união. As estruturas de camada híbrida e formação de *tags* de resina no interior dos túbulos dentinários, são os dois principais mecanismos que representam a união dos adesivos à dentina. Ambas as estruturas podem apresentar variações morfológicas e funcionais dependendo da categoria de adesivo utilizado.

A evolução dos adesivos, além de promover uma melhora na resistência de união, também tem a tendência de diminuir os passos clínicos e assim diminuir o tempo clínico necessário para realizar uma restauração. Porém, mesmo os

adesivos com bons resultados de resistência de união ainda apresentam uma deficiência no selamento da interface adesiva (Carvalho *et al.,* 2012; Catanhede de Sá *et al.,* 2012)

O pré-requisito para o sucesso das restaurações é o completo selamento da interface adesiva (Imazato *et al*., 2003). As falhas na união provocadas pela contração de polimerização ou pela degradação dos adesivos levam à formação de fendas marginais (Carvalho *et al*., 1996; Meira *et al*., 2007, Reis *et al.,* 2010), por onde ocorre a infiltração das bactérias entre as margens da cavidade e o material restaurador (Shinohara *et al.,* 2006, Shinohara *et al.,* 2009, Imazato *et al*., 2003). Dependendo das condições orais, como a presença de biofilme e consumo de açúcares fermentáveis, pode-se iniciar uma lesão recorrente a partir dessas fendas (Bowen & Pearson, 1992; Lingström *et al*., 2000) na parede cavitária. As cáries secundárias são uma das principais causas de substituição de restaurações (Fontana & Gonzales-Cabezas, 2000, Kidd *et al.,*1992, Kidd, 2001) e, por esse motivo, a introdução de agentes antimicrobianos nos sistemas adesivos pode ser uma alternativa para a prevenção da cárie recorrente, impedindo a colonização e o crescimento bacteriano, assim como a produção de seus ácidos causadores da desmineralização dental.

Hoje muito se fala em Odontologia Minimamente Invasiva (Tyas, Anusavice & Frencken, 2000), que compreende a mínima remoção do tecido dental sadio, ou a remoção parcial do tecido cariado. Quando há a remoção parcial do tecido cariado pode haver a manutenção de bactérias residuais na cavidade (Imazato S, *et al.*, 2006). Os adesivos dentinários com antimicrobianos podem ser uma

alternativa para a descontaminação dessa cavidade. Além disso, eles podem impedir a formação de uma nova lesão cariosa na área de união e o resultado seria um aumento da longevidade da restauração de resina composta (Esteves *et al.,* 2010).

Portanto, além da diminuição dos passos clínicos e melhora na resistência de união, a evolução dos adesivos, atualmente, também pode ser focada na inclusão de agentes que inibam o processo da recorrência da cárie, que pode melhorar a longevidade clínica das restaurações e evitar a perda de substrato dentinário.

Uma das substâncias já adicionada ao adesivo dentinário é a clorexidina (Peak Universal Bond – Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). A clorexidina tem um amplo espectro de ação contra as bactérias aeróbias e anaeróbias. Ela apresenta uma maior atividade contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas (Athanassiadis *et. al.,* 2007).

A clorexidina é uma molécula hidrófoba e lipofílica que se dissocia em soluções para formar cargas iônicas positivas que interagem com os fosfolipídeos e lipopolissacarídeos na membrana celular da bactéria, e assim entra na célula através de um mecanismo de transporte ativo ou passivo. A sua eficácia se deve à interação da sua carga positiva com a carga negativa do grupo fosfato na parede celular microbiana, alterando o equilíbrio osmótico celular. Essa alteração no equilíbrio permite a entrada da clorexidina na célula bacteriana (Mohammadi & Abbott, 2009).

A estabilização da clorexidina se dá através de um sal. O mais comumente utilizado em Odontologia é o digluconato de clorexidina, que é um sal solúvel em água e que se dissocia liberando o componente de carga positiva. Em baixa concentração (0,2%), substâncias de baixo peso molecular (potássio e fósforo) são extravasadas da bactéria. Já em altas concentrações (2%) a clorexidina é bactericida e, por precipitação do conteúdo citoplasmático, ocorre a morte celular (Athanassiadis *et. al.,* 2007).

Para Carrilho *et al.* (2007), após 14 meses, a dentina quando tratada com clorexidina após o condicionamento ácido exibiu resistência de união e outras propriedades similares àquelas apresentadas 24 horas após a confecção das restaurações. Assim, a clorexidina não reduz a resistência de união e não altera a morfologia da camada híbrida, devendo ser utilizada após o condicionamento ácido para evitar a degradação precoce da camada híbrida. O papel da clorexidina seria inibir as metaloproteinases (Carrilho *et al.,* 2007, Liu *et al.*, 2011).

O digluconato de clorexidina a 0,5% e a 2% utilizado antes da aplicação do sistema adesivo não resulta em redução da resistência de união imediata quando comparada ao grupo controle (sem aplicação da clorexidina) (Breschi *et al.,* 2009). A clorexidina, por apresentar atividade antibacteriana de amplo espectro de ação, tem sido normalmente utilizada nas cavidades dentinárias e nos canais infectados, antes da restauração ou da inserção do material obturador (Hiraishi *et al.,* 2010).

Outra evolução nos adesivos dentinários foi adição do monômero antibacteriano 12-metacriloiloxidodecilpiridínio brometo (MDPB) (Figura 1). Esse

monômero é encontrado no *primer* do Clearfil SE Protect (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Japão). O MDPB é um análogo de um potente bactericida, o CPC (Cloreto de Cetilpiridínio), sintetizado a partir do dodecil piridínio (Imazato, 2009). De acordo com Imazato *et al.* (2006), sua ação antimicrobiana se deve ao fato de ser catiônico e hidrófobo, ligando-se aos componentes da parede celular bacteriana e causando um distúrbio na função da membrana e, subsequentemente, induzindo ao extravasamento do material citoplasmático. A figura abaixo mostra a cadeia molecular do MDPB.

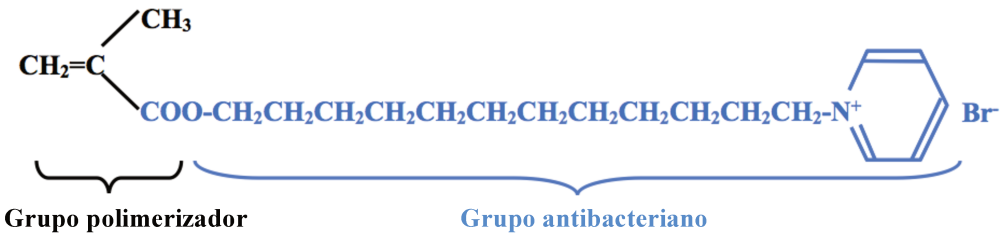

Figura 1. Monômero 12-metacriloiloxidodecilpiridínio brometo (MDPB).

Quando as bactérias invadem as fendas na interface adesiva, elas entram em contato com o adesivo polimerizado (Imazato, 2003). Segundo Imazato, é possível que os adesivos que contem o monômero MDPB possam inibir o crescimento das bactérias que invadiram essa fenda e inibir a infiltração bacteriana, mesmo quando o selamento marginal não está completo ou foi degradado após a restauração.

O monômero MDPB não polimerizado possui uma forte atividade antibacteriana (Imazato *et al.,* 1999, Pashley *et al.,* 2011). A incorporação do primer MDPB demonstrou efeito bactericida antes de ser polimerizado, indicando a possibilidade de matar as bactérias residuais na cavidade preparada (Imazato *et al.,* 1997). O *primer* polimerizado pode mostrar inibição do crescimento bacteriano, que esteve em contato com a superfície (Imazato *et al.,* 1998). Portanto, segundo Imazato *et al.* (2003), a incorporação do MDPB no sistema adesivo é considerado efetivo, possibilitando um efeito antibacteriano, mesmo após polimerizado, contra as bactérias invasoras.

O *primer* do adesivo Clearfil SE Protect (Kuraray), que contem o monômero MDPB, tem demostrado apresentar alta resistência de união ao esmalte e à dentina. Uma vez que o MDPB pode ser polimerizado e imobilizado no polímero, a interface adesiva do Clearfil SE Protect é considerada estável mesmo após longo tempo clínico (Donmez *et al.,* 2005, Imazato *et al.,* 2006). O *primer* polimerizado produziu inibição do crescimento bacteriano na sua superfície (Imazato *et al.,* 2006).

O adesivo Gluma 2Bond (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha) possui em sua formulação o componente glutaraldeído. O glutaraldeído tem um amplo espectro de atividade contra as bactérias e seus esporos, fungos e vírus. Os relatos de sua ação antimicrobiana datam desde 1964 (Gorman *et al.,* 1980). Estudos posteriores confirmaram sua ação bactericida e esporicida. Esses estudos demostraram uma ligação forte do glutaraldeído com a camada externa

dos microrganismos como *Escherichia Coli* e *Staphylococcus aureus*, inibição do transporte nas bactérias gram-positivas, inibição da atividade desidrogenase e das enzimas periplasmáticas, inibição do RNA, DNA e síntese protéica (Mc Donnell & Denver Russel, 1999; Gorman & Scott, 1977; McGucken & Woodside, 1973)

O mecanismo de ação do glutaraldeído envolve uma forte associação com a camada externa da célula bacteriana, especificamente com aminas não protonadas na superfície celular, possivelmente representando os locais reativos. Nas bactérias gram-positivas e gram-negativas não esporuladas há uma forte associação com a camada externa por meio de ligações com o grupamento amina nas proteínas e inibição do processo de transporte intracelular (Mc Donnell & Denver Russel, 1999). Tem sido relatado, também, que o glutaraldeído pode modificar a estrutura das fibrilas colágenas e melhorar sua resistência a degradação, assim como a sua estabilização (Fang *et al.,* 2012).

O glutaraldeído tem sido adicionado ao sistema adesivo desde 1984, com a finalidade de impedir a infiltração bacteriana nas fendas da interface produzida pela contração da resina composta (Munksgaard & Asmussem, 1984, Fraga *et al.,* 1996). Em 1989, Felton *et al.,* após tratar as cavidades com o Gluma contendo glutaraldeído, observou que não havia crescimento bacteriano na cavidade interface/restauração. O glutaraldeído reduz a permeabilidade dentinária e ao mesmo tempo desinfeta a dentina (Ritter *et al.,* 2001, Stawarczyk *et al.,* 2011).

O *primer* do Gluma autoadesivo exibiu zonas de inibição comparáveis à solução de clorexidina à 0,2% (Emilson & Bergenholtz, 1993). Quando se compara o Gluma com e sem glutaraldeído, observa-se pouca diferença na atividade antibacteriana entre os dois adesivos. Isso sugere que o glutaraldeído, conhecido pela sua propriedade desinfetante, pode exibir um efeito antibacteriano transitório, ou seu efeito pode ser suprimido por outros componentes do adesivo após polimerização e envelhecimento (Walter *et al.,* 2007).

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* teve como objetivo geral: (1) avaliar a união entre o tecido dentinário e três adesivos/resina composta e (2) analisar a atividade antimicrobiana desses sistemas adesivos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a resistência de união restauração-dentina de três sistemas adesivos, 24 horas após a confecção das restaurações ou após armazenamento por 1 ano em saliva artificial, utilizando o ensaio de microtração. Adicionalmente, os tipos de padrão de fratura foram classificados para cada adesivo utilizado.
- Observar a área de união dentina-sistema adesivo-restauração, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Mensurar as zonas de inibição microbianas (4 espécies bacterianas facultativas) formadas pela aplicação dos adesivos odontológicos e grupos controles.
- Determinar a atividade bactericida por contato para os três sistemas adesivos e grupos controles (4 espécies bacterianas facultativas).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental:

Este projeto compreende 4 análises e/ou ensaios, que empregaram as seguintes metodologias: (1) Ensaio de resistência de união por microtração, (2) Análise da interface dentina-sistema adesivo (MEV) (3) Determinação do halo de inibição, (4) Determinação da atividade bactericida por contato.

No estudo de Resistência de União foram utilizados dentes humanos e, portanto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (Processo 139/2010) (Anexo 1). Neste estudo foram utilizados um total de 36 terceiros molares, sendo 30 (n=10) para o estudo de microtração e 6 (n=2) para o estudo da morfologia da área de união dentina-resina. Os grupos experimentais foram aleatoriamente divididos em:

- Grupo 1: Adesivo Gluma 2Bond (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha).
- Grupo 2: Adesivo Clearfil SE Protect (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Japão).
- Grupo 3: Adesivo Peak Universal Bond (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos adesivos e o comportamento antibacteriano desses materiais odontológicos os seguintes microrganismos foram utilizados:

- Bactérias facultativas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Lactobacillus casei* (ATCC L324M) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

As composições dos sistemas adesivos (Figura 2) testados neste estudo estão presentes na Tabela 1 e as instruções dos fabricantes estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Composição dos materiais.

Material (classificação)	**Composição (número de Lote)**
Gluma 2Bond (convencional*)	Condicionador: ácido fosfórico 35% (Lote nº 268475C). Adesivo: etanol, 2-hidroxietil metacrilato, poli (ácido metacrilico-oligo-acrílico), ácido 4-metacriloxietiltrimelitico anidrido, glutaraldeído (Lote nº 010031).
Clearfil SE Protect (autocondicionante)	Primer: 2-hidroxietil metacrilato, 10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato, 12-metacriloiloxidodecilpiridino brometo, dimetacrilato hidrófilo alifático, água, iniciadores, corantes (Lote nº 00087A). Bond: bisfenol A diglicidilmetacrilato, 10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato, dimetacrilato hidrófilo alifático, sílica coloidal, 2-hidroxietil metacrilato, fluoreto de sódio, canforoquinona, iniciadores (Lote nº 00143A).
Peak Universal Bond (autocondicionante e convencional*)	Condicionador: ácido fosfórico 35% (Lote nº 268475C). Adesivo: Etanol, 2-hidroxietil metacrilato, ácido metacrílico, clorexidina (Lote nº 0063).

* Convencional: adesivos utilizados com condicionamento ácido separado e técnica úmida.

Tabela 2. Instruções dos fabricantes para aplicação dos adesivos.

Material	Instruções do fabricante
Gluma 2Bond	Condicionar esmalte e dentina com ácido fosfórico (dentina úmida). Aplicar o adesivo e deixar por 15 s. Aplicar um leve jato de ar. Fotoativar por 20 s.
Clearfil SE Protect	Aplicar o primer e deixar agir por 20 s. Aplicar um leve jato de ar. Aplicar o bond. Aplicar um leve jato de ar. Fotoativar por 10 s.
Peak Universal Bond	Técnica de condicionamento com ácido fosfórico: Condicionar esmalte e dentina com ácido fosfórico (dentina úmida). Aplicar o adesivo por 10 s. Aplicar um leve jato de ar por 10 s. Fotoativar por 10 s (ou 20 s para luzes com intensidade < 600mW/cm^2)

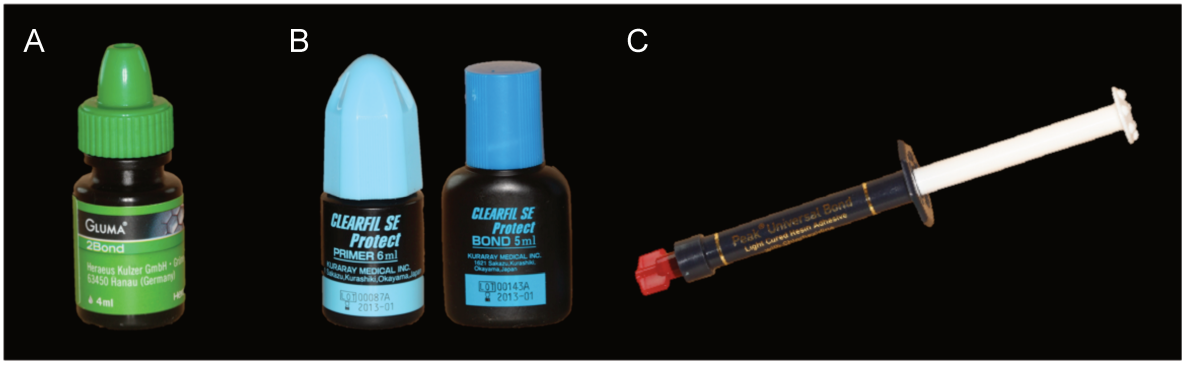

Figura 2. Adesivos contendo antimicrobianos. (A) Gluma 2Bond. (B) Clearfil SE Protect. (C) Peak Universal Bond.

4.2. Resistência de União (Teste de Microtração):

Para o ensaio de resistência de união, dois foram os fatores em estudo: Sistemas Adesivos (3 tipos) e Tempo da Avaliação (dois tempos: 24 horas e 1 ano). Foram utilizados para esta parte do projeto 30 terceiros molares humanos. Os dentes foram submetidos à raspagem manual com cureta periodontal (Duflex, SS White, Juiz de Fora, MG, Brasil) para remoção de debris orgânicos e polidos com taça de borracha (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) e pasta de pedra-pomes (SS White, Juiz de Fora, MG, Brasil) e água. Em seguida, esses dentes foram armazenados em água destilada até o momento da sua utilização.

O estudo da resistência de união dos adesivos/resina utilizou a metodologia de microtração descrita por Sano *et al.* (1994) e modificado por Shono *et al.* (1999). Inicialmente, os dentes tiveram o esmalte oclusal removido com disco diamantado (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) para a exposição da superfície dentinária numa profundidade média em relação à polpa. As superfícies dentinárias foram abrasionadas com lixas de carbeto de silício (granulação 600), sob refrigeração com água durante 10 segundos, para padronização da *smear layer* e planificação do substrato dentinário. Em seguida, os dentes foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais (n=10), que correspondem aos adesivos testados. Os espécimes foram testados após 2 tempos de armazenamento: 24 horas e 1 ano.

O condicionamento com ácido fosfórico foi realizado previamente à aplicação dos adesivos convencionais: Gluma 2Bond e Peak Universal Bond. Após a aplicação e a fotoativação dos agentes de união, a resina composta na cor

A2 (Filtek Supreme, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi inserida na superfície dentária tratada pelo adesivo. Foram aplicadas 3 camadas de resina (para facilitar a fixação do espécime no dispositivo de microtração), com incrementos de 2 mm de espessura e fotoativados por 20 segundos cada, formando um bloco de compósito de aproximadamente 6 mm de altura (Figura 3). Nos procedimentos restauradores, os adesivos e a resina composta foram utilizados de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes e fotopolimerizados com aparelho de lâmpada halógena (600mW/cm^2) Optilux 501 (Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA). A intensidade da luz emitida pelo aparelho foi verificada periodicamente com radiômetro (Demetron). Os dentes restaurados foram mantidos em 100% de umidade a 37 ºC por 24 horas.

Em seguida foram realizadas secções vestíbulo-linguais e mésio-distais, perpendiculares à interface de união dos dentes restaurados (Figura 4). Para as secções foi utilizado um disco de alta concentração de diamante (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), obtendo-se no mínimo de 6 a 8 espécimes por dente, com o formato de paralelepípedos ou “palitos”, com área na secção transversal de aproximadamente 1,0 mm^2. Metade do número de palitos (3 a 4) foram armazenados por 24 horas e a outra metade armazenados em saliva artificial por 1 ano à 37 ^{o}C, em tubos “eppendorfs”, até o momento do ensaio de microtração.

As amostras não foram submetidas a esforços mecânicos para evitar fraturas precoces, entretanto, foram armazenados com dentina exposta pelos quatro lados dos espécimes, com a finalidade de acelerar a degradação da união (Reis *et al.,* 2008). O armazenamento por 1 ano foi feito em solução com pH

neutro de saliva artificial para não provocar desmineralização ou qualquer tipo de dano aos espécimes restaurados, visando apenas o efeito do armazenamento e da degradação hidrolítica a 37 ^{o}C. A saliva foi substituída a cada 2 semanas com a finalidade de evitar a formação de fungos, colonização de bactérias e evitar o uso de agentes antimicrobianos, os quais poderiam interferir nos resultados desta pesquisa. A opção pelo armazenamento dos “palitos”, ao invés dos dentes restaurados, se deve ao fato de que existe a possibilidade de perda da amostra restaurada (armazenada por 1 ano) durante a secção para obtenção dos “palitos”. O deslocamento das restaurações poderia causar a perda do trabalho se algum material apresentasse baixa resistência de união após o armazenamento.

Os espécimes foram testados em um dispositivo para microtração acoplado a uma máquina universal de ensaio (EZ Test, Shimadzu Corp., Tóquio, Japão). Cada espécime foi fixado com cola à base de cianoacrilato (Super Bonder, Henkel/Loctite) nas garras específicas do dispositivo de microtração e testados sob velocidade constante de 0,5 mm/min até o momento da fratura do espécime (Figura 5). O valor da carga para ruptura da união em quilogramas-força (Kgf) foi registrado e a resistência de união dos grupos calculada em MegaPascal (MPa) a partir da área de secção transversal dos espécimes, que foi mensurada com paquímetro digital (Starrett 727-2001, Itu, SP, Brasil). A média por grupo foi calculada a partir da média dos espécimes por dente.

Após análise exploratória dos dados foi aplicada análise de variância "2 way" e teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% (Fatores: Adesivo e Tempo de armazenamento) (Anexo 2).

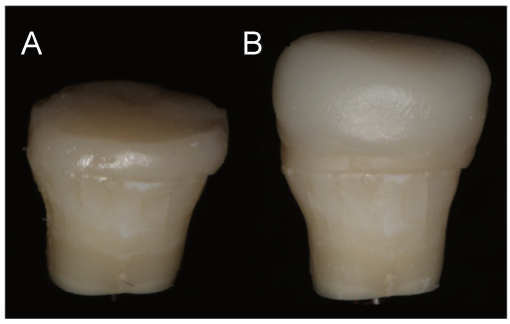

Figura 3. (A) Primeiro incremento de resina composta (2 mm). (B) Três incrementos de resina composta (totalizando 6 mm).

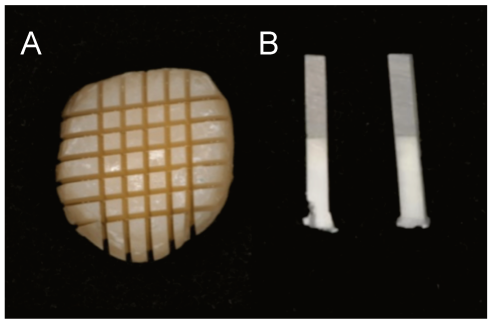

Figura 4. (A) Dente seccionado para obtenção dos espécimes no formato de palito. (B) espécimes no formato de palito.

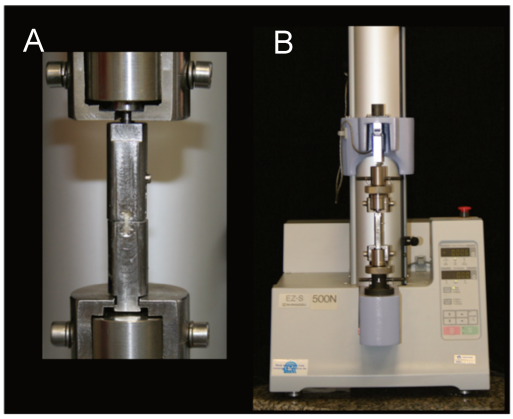

Figura 5. (A) Espécime fixado no dispositivo de microtração. (B) dispositivo acoplado à EZ-Test.

4.3. Análise do Padrão de Fratura dos Espécimes Testados:

As superfícies envolvidas na fratura de cada espécime foram analisadas em MEV para classificação quanto ao padrão de fratura. Os espécimes fraturados

(Figura 6) foram fixados com resina composta fotopolimerizável em *stubs* metálicos, mantendo as áreas envolvidas nas fraturas voltadas para cima (Figura 7). Em seguida, esses fragmentos foram metalizados (Bal-Tec SDC 050 Sputter coater / Balzers-Liechtenstein) e observados em MEV (JSM 5600LV, Jeol, Tóquio, Japão) com aumentos entre 100x e 2.000x.

A classificação do padrão de fratura foi realizada segundo as estruturas envolvidas:

- Tipo 1: falha coesiva na resina composta;
    - Caracterizada pela presença de resina composta nas duas superfícies envolvidas.
- Tipo 2: falha adesiva entre a resina composta e o agente de união;
    - Caracterizada pela presença da resina composta em uma superfície e o adesivo recobrindo a dentina na outra superfície.
- Tipo 3: falha adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união;
    - Caracterizada pela presença de resina composta recoberta pelo adesivo em uma superfície e pela exposição dos túbulos dentinários na outra superfície.
- Tipo 4: falha mista;
    - Caracterizada pela exposição da superfície dentinária, do adesivo e pela presença da resina composta.
- Tipo 5: falha coesiva no sistema adesivo;

- Caracterizada pela presença do adesivo em ambas as superfícies, com aspecto semelhante a “escamas”.

- Tipo 6: falha coesiva na camada híbrida;
  - Caracterizada pela presença de *tags* de resina nos túbulos dentinários.
- Tipo 7: falha coesiva na dentina.
  - Caracterizada pela presença de dentina em ambas as superfícies.

Para que o padrão fosse considerado não misto, 70% ou mais do tipo de padrão específico deveria estar presente na superfície avaliada.

Figura 6. Amostra fraturada após o teste de microtração.

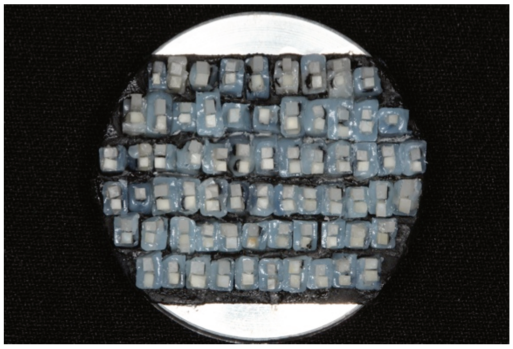

Figura 7. Amostras testadas e montadas em *stub* para visualização em MEV.

4.4. Análise da Área de União Dentina-Sistema Adesivo:

Para a análise da área de união dentina-sistema adesivo, 6 dentes tiveram o esmalte oclusal removido com disco diamantado (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), para a exposição da superfície dentinária numa profundidade média em

relação à polpa. As superfícies dentinárias foram abrasionadas com lixas de carbeto de silício (granulação 600), sob refrigeração com água durante 10 segundos, para padronização da *smear layer* e planificação do substrato dentinário. Em seguida, os dentes foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais (n = 2), que correspondem aos adesivos testados.

O condicionamento com ácido fosfórico foi realizado previamente à aplicação dos adesivos convencionais: Gluma 2Bond e Peak Universal Bond. Após a aplicação e a fotoativação do agente de união, apenas um incremento da resina composta foi inserido na superfície dentária tratada pelo adesivo, e fotoativada por 20 segundos. Os adesivos e a resina composta foram utilizados de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes e fotopolimerizados com aparelho de lâmpada halógena (600mW/cm^2) Optilux 501 (Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA). Para cada adesivo foi utilizado uma resina composta do mesmo fabricante: Charisma Opal (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha), Clearfil Majesty (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Japão) e Amelogen Plus (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). Os dentes restaurados foram mantidos em 100% de umidade à 37 ºC por 24 horas.

Em seguida, os dentes foram seccionados ao meio com um disco de alta concentração de diamante (Buehler Ltd.), com um corte no sentido mesio-distal. Essas metades foram incluídas em resina acrílica (Figura 8) para facilitar o polimento e a desidratação dos espécimes. A interface adesiva permaneceu livre de resina acrílica para possibilitar o polimento e a desidratação, assim como a visualização em MEV. Para o polimento, os espécimes incluídos em resina

passaram por uma sequência de lixas: 30 segundos em lixa de carbeto de silício granulação 600, 5 minutos em lixa de carbeto de silício granulação 1200 e 10 minutos em lixa de carbeto de silício granulação 2000 (Figura 9). Entre as lixas e após a última granulação os espécimes foram levados a uma cuba ultrassônica, por 12 min e 20 min respectivamente, para a remoção dos debris gerado pelo polimento.

Após a sequência de lixas, os espécimes foram polidos com feltros e pastas diamantadas **(**Arotec S.A. Indústria e Comércio, Cotia, São Paulo, Brasil)**.** As pastas foram utilizadas com os seus respectivos feltros na seguinte sequência: 6 µm, 3 µm, 1 µm e ¼ µm. Para a remoção dos resíduos, os espécimes foram levados à cuba ultrassônica por 12 min, com água destilada, entre cada granulação das pastas, e por 20 min após a última pasta. Após o polimento, foi aplicado ácido fosfórico à 50% nas amostras por 5 segundos, lavados em água corrente por 15 segundos, aplicado hipoclorito à 10% por 10 minutos e, em seguida, mantidos em água destilada em uma cuba ultrassônica por 30 minutos.

Para a desidratação, os espécimes foram colocados em etanol seguindo o protocolo: etanol 25% por 20 minutos, etanol 50% por 20 minutos, etanol 75% por 20 minutos, etanol 95% por 30 minutos e etanol 100% por 60 minutos (Figura 10). Para a fixação foi utilizado o HMDS (que promove suporte estrutural por ligações cruzadas com as proteínas) por 10 minutos. Após o protocolo de desidratação, os espécimes foram mantidos em temperatura ambiente por 24 horas antes da metalização com ouro (Bal-Tec SDC 050 Sputter coater, Balzers, Liechtenstein)

(Figura 11) para a visualização em MEV (JSM 5600LV, Jeol, Tóquio, Japão) com aumentos de 500x e 1000x.

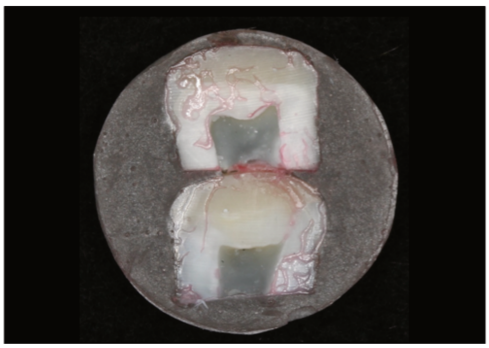

Figura 8. Amostra seccionada ao meio e incluída em resina acrílica com a interface adesiva livre de resina.

Figura 9. Polimento da amostra incluída em resina.

Figura 10. Amostras colocadas em um Becker para sequência de desidratação.

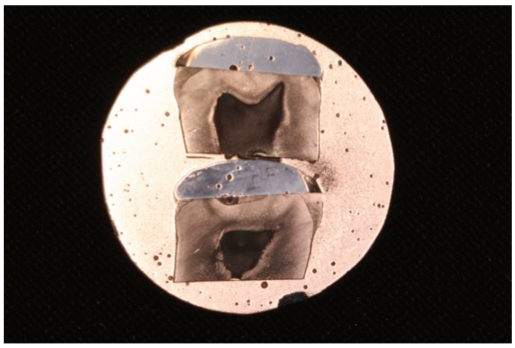

Figura 11. Amostra metalizada após o polimento e desidratação.

4.5. Halo de Inibição:

Para a leitura dos halos de inibição de crescimento microbiano foi realizado o método clássico de difusão radial em ágar com algumas modificações (método da camada dupla para os microrganismos facultativos) (Figura 12). Os organismos foram subcultivados em placas de BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) sangue

(Figura 12 A) e incubados de 18 a 24 horas a 37ºC em 10% de CO_2 (estufa de CO_2, Jouan GmbH, Saint-Herblain, França).

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas dos microrganismos foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI (Figura 12 B). Após agitação mecânica, a densidade óptica foi ajustada em espectrofotômetro com transmitância de 530nm, até atingir a concentração equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland (1.5×10^8 bactéria/mL). Tal concentração de inóculos foi utilizada por promover crescimento semi-confluente de todos os microrganismos testados (Koo *et al.*, 2000).

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos adesivos testados frente às bactérias foram utilizadas placas de 150 mm de diâmetro por 20 mm de altura. Inicialmente, foram preparadas as placas contendo 40 mL de MHA (*Mueller Hinton Agar*, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemanha) que serviram de base (Figura 12 D) para a camada de inóculo (seed) (Figura 12 E), que foi preparada em seguida. Quarenta mL de BHIA foram preparados e autoclavados em frascos de vidro com tampas rosqueáveis. Durante o processo de resfriamento, quando o BHIA atingiu 45ºC, ainda em estado líquido, se adicionou 400 μL do inóculo microbiano e se promoveu agitação uniforme do conjunto. O BHIA passou a ter, portanto, 1% de inóculo microbiano (Figura 12 C), que foi distribuído sobre a camada sólida de MHA. Foi aguardado a solidificação do meio de cultura.

Após a solidificação dos meios de cultura, cilindros de plástico transparente descartáveis e estéreis (5,57 x 4,82 mm) foram dispostos sobre a superfície do

ágar (Figura 12 F). Foi utilizado uma placa para cada grupo, sendo os cilindros colocados em triplicata (3 cilindros em cada placa). Para os grupos controles dos adesivos foram adicionados mais 3 sistemas adesivos com a mesma composição dos adesivos testados porém sem as substâncias antimicrobianas, sendo eles: Gluma Comfort Bond (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha) (adesivo sem glutaraldeído – controle negativo do adesivo Gluma 2Bond); Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Japão) (adesivo sem o monômero MDPB – controle negativo para o adesivo Clearfil SE Protect) e Peak LC Bond (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) (adesivo sem clorexidina – controle negativo para o adesivo Peak Universal Bond). A composição dos adesivos controles estão presentes na Tabela 3. Além dos adesivos foram testados mais 4 grupos para controle. Solução salina 0,89% para o controle negativo; digluconato de clorexidina 2% e 0,2% e glutaraldeído 5% para os grupos controles positivos (Tabela 4). Os adesivos foram fotoativados por 10 segundos (Optilux 501, Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA) ou permaneceram não polimerizados. As placas foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente para permitir a difusão das substâncias na superfície do ágar.

As placas foram mantidas a 37ºC em condições gasosas apropriadas: em estufa de CO_2 à 37ºC por 24 horas. Após o período de incubação, foram mensurados os halos das placas com auxílio de um paquímetro digital. A mensuração do halo de inibição é rotineiramente usada para determinar a sensibilidade a agentes antimicrobianos de microrganismos patogênicos (Napimoga, Oliveira, Reis, Gonçalves & Giannini, 2007).

Após o crescimento bacteriano os halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Kanagawa, Japão). Após a análise exploratória e a constatação de que os dados não atendem as pressuposições de uma análise paramétrica foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Dunn considerando o nível de significância de 5%.

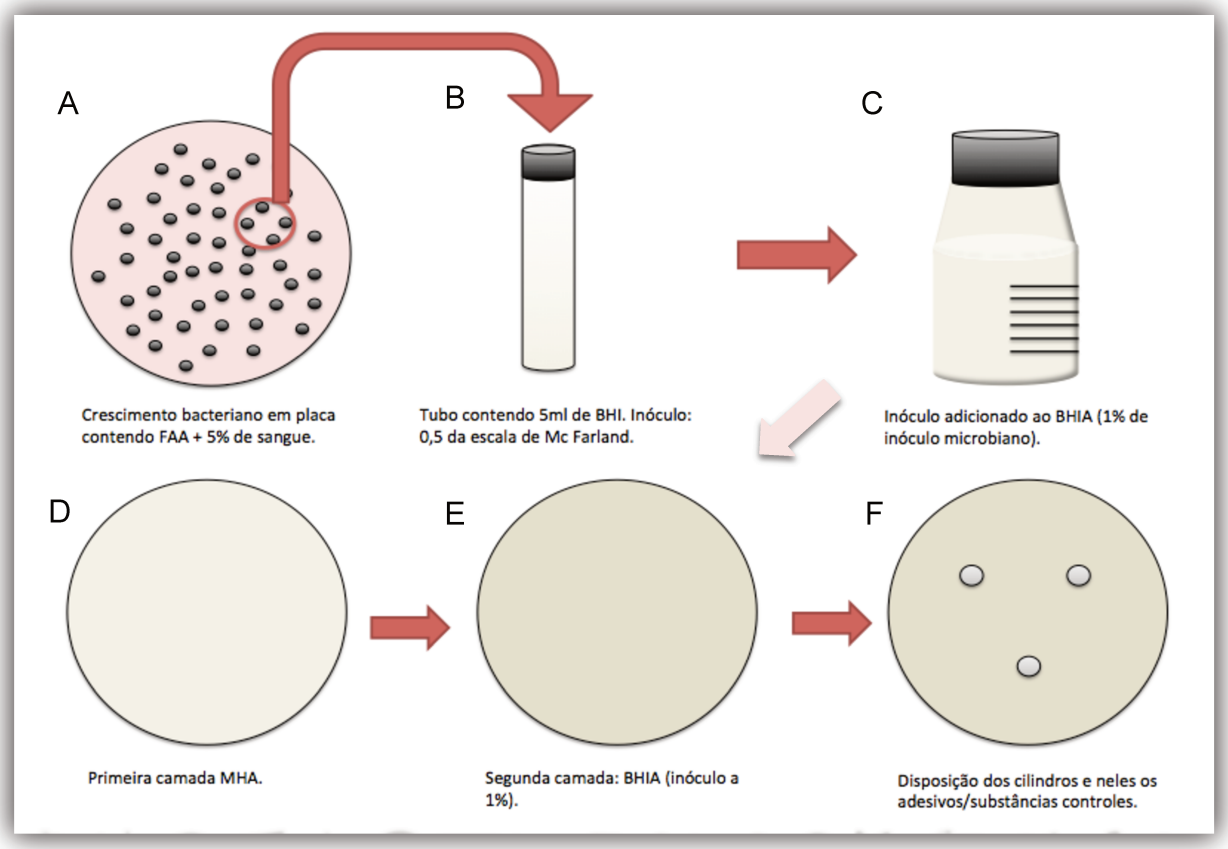

Figura 12. Preparo do Halo de Inibição para as bactérias facultativas. (A) Crescimento das espécies bacterianas. (B) Preparo do inóculo. (C) Adição do inóculo ao BHIA (segunda camada). (D) Adição da primeira camada (MHA) à placa de petri. (E) Adição da segunda camada à placa de petri. (F) Colocação (após a segunda camada) dos cilindros para posterior adição dos adesivos.

Tabela 3. Composição dos materiais controles.

Material (classificação)	**Composição (número de Lote)**
Gluma Comfort Bond (convencional*)	Condicionador: ácido fosfórico 35% (Lote nº 268475C). Adesivo: etanol, 2-hidroxietil metacrilato, poli (ácido metacrilico-oligo-acrílico), ácido 4-metacriloxietiltrimelitico anidrido. (Lote nº 010205).
Clearfil SE Bond (autocondicionante)	Primer: 2-hidroxietil metacrilato, 10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato, dimetacrilato hidrófilo alifático, água, aceleradores, corantes (Lote nº 01089A). Bond: bisfenol A diglicidilmetacrilato, 2-hidroxietil metacrilato, 10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato, metacrilato hidrófilo alifático, sílica coloidal, canforoquinona, iniciadores e aceleradores (Lote nº 01628A).
Peak LC Bond (convencional*)	Condicionador: ácido fosfórico 35% (Lote nº 268475C). Adesivo: Etanol, 2-hidroxietil metacrilato, ácido metacrílico, 4- etil-dimetilamino benzoato (Lote nº D053).

* Convencional: adesivos utilizados com condicionamento ácido separado e técnica úmida.

Tabela 4. Grupos para o halo de inibição.

A	Gluma 2Bond (polimerizado)	Teste
B	Gluma Comfort Bond (polimerizado)	Controle negativo do A
C	*Primer* Clearfil SE Protect (polimerizado)	Teste
D	Clearfil SE Protect (polimerizado)	Teste
E	Clearfil SE Bond (polimerizado)	Controle negativo do D
F	Peak Universal Bond (polimerizado)	Teste
G	Peak LC Bond (polimerizado)	Controle negativo do F
H	Soro Fisiológico	Controle negativo *
I	Digluconato de Clorexidina 2%	Controle positivo **
J	Digluconato de Clorexidina 0,2%	Controle positivo do F
K	Glutaraldeído 5%	Controle positivo do A
L	Gluma 2Bond (não polimerizado)	Teste
M	*Primer* Clearfil SE Protect (não polimerizado)	Teste
N	Clearfil SE Protect (não polimerizado)	Teste
O	Peak Universal Bond (não polimerizado)	Teste

* Controle negativo para todos os grupos

** Controle positivo para todos os grupos

4.6. Determinação da Atividade Bactericida por Contato:

A determinação da atividade bactericida por contato foi realizada através da modificação da metodologia de concentração bactericida mínima. Essa metodologia foi modificada para todas as amostras bacterianas, ao invés da

microdiluição em caldo, as concentrações de cada adesivo foram mantidas as mesmas, visando manter a concentração já estipulada por cada fabricante. Foram utilizados os mesmos controles positivos e negativos do halo de inibição (Gluma Comfort Bond (adesivo sem glutaraldeído – controle negativo do adesivo Gluma 2Bond); Clearfil SE Bond (adesivo sem o monômero MDPB – controle negativo para o adesivo Clearfil SE Protect), Peak LC Bond (adesivo sem clorexidina – controle negativo para o adesivo Peak Universal Bond, soro fisiológico para o controle negativo; digluconato de clorexidina 2% e 0,2% e glutaraldeído 5% para os grupos controles positivos). Os organismos facultativos foram subcultivados em placas de BHIA sangue e incubados por 18 a 24 horas a 37ºC em 10% CO_2 (estufa de CO_2, Jouan, Saint-Herblain, França).

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI (Figura 14 A e B). Após agitação mecânica, a densidade óptica foi ajustada em espectrofotômetro com transmitância de 530 nm, até atingir a concentração equivalente à 0,5 da escala de Mc Farland (1.5×10^8 bactéria/mL). Tal concentração de inóculos foi utilizada por promover crescimento semi-confluente de todos os microrganismos testados (Koo *et al.,* 2000).

Para a avaliação dos adesivos 30 µL de cada adesivo foi dispensado em uma matriz cilíndrica estéril e polimerizado (Figura 13). Cada cilindro foi colocado em um dos poços (placa de 96 poços) contendo 90 µL do inóculo (teste realizado em triplicata). Para os controles positivos e negativos (soro fisiológico para o controle negativo; digluconato de clorexidina 2% e 0,2% e glutaraldeído 5% para

os grupos controles positivos) foram dispensados também 30 µL das soluções líquidas nos poços contendo 90 µL do inóculo. Três poços sem a solução dos adesivos ou substâncias controles foram utilizados também como controle positivo de crescimento, contendo apenas o inóculo (Figura 14C). Os grupos testados estão descritos na Tabela 5. A suspensão bacteriana foi utilizada no prazo máximo de 60 minutos após o ajuste da concentração.

Após o contato da substância com o inóculo foram retirados 5 µL de cada poço (todos os grupos) e plaqueados em FAA + sangue (placas de 150 x 20 mm), nos seguintes tempos: 5 min, 10 min, 30 min, 1 hora e 24 horas (Figura 14 D). Após 24 horas do foi verificado se houve crescimento bacteriano. Quando houve crescimento foi considerado não bactericida.

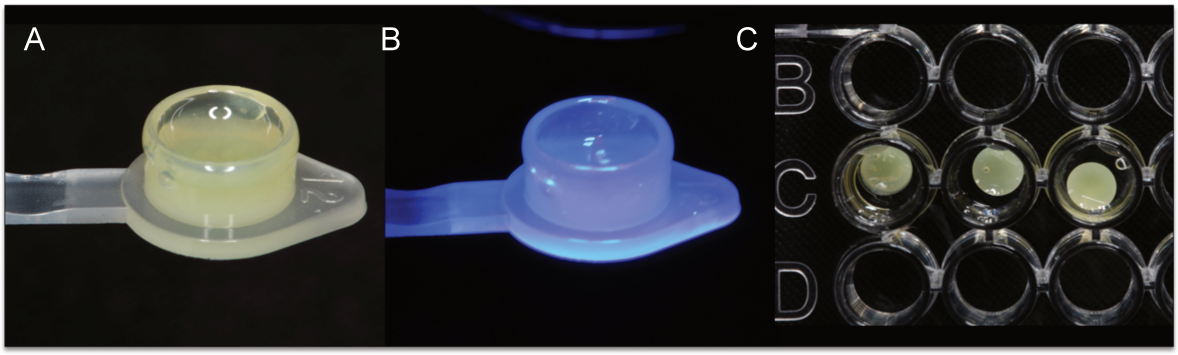

Figura 13. Preparo dos adesivos para a determinação da atividade bactericida por contato. (A) Colocação do adesivo em uma tampa de eppendorf estéril. (B) Polimerização do adesivo. (C) Colocação das amostras em uma placa de 96 poços (triplicata).

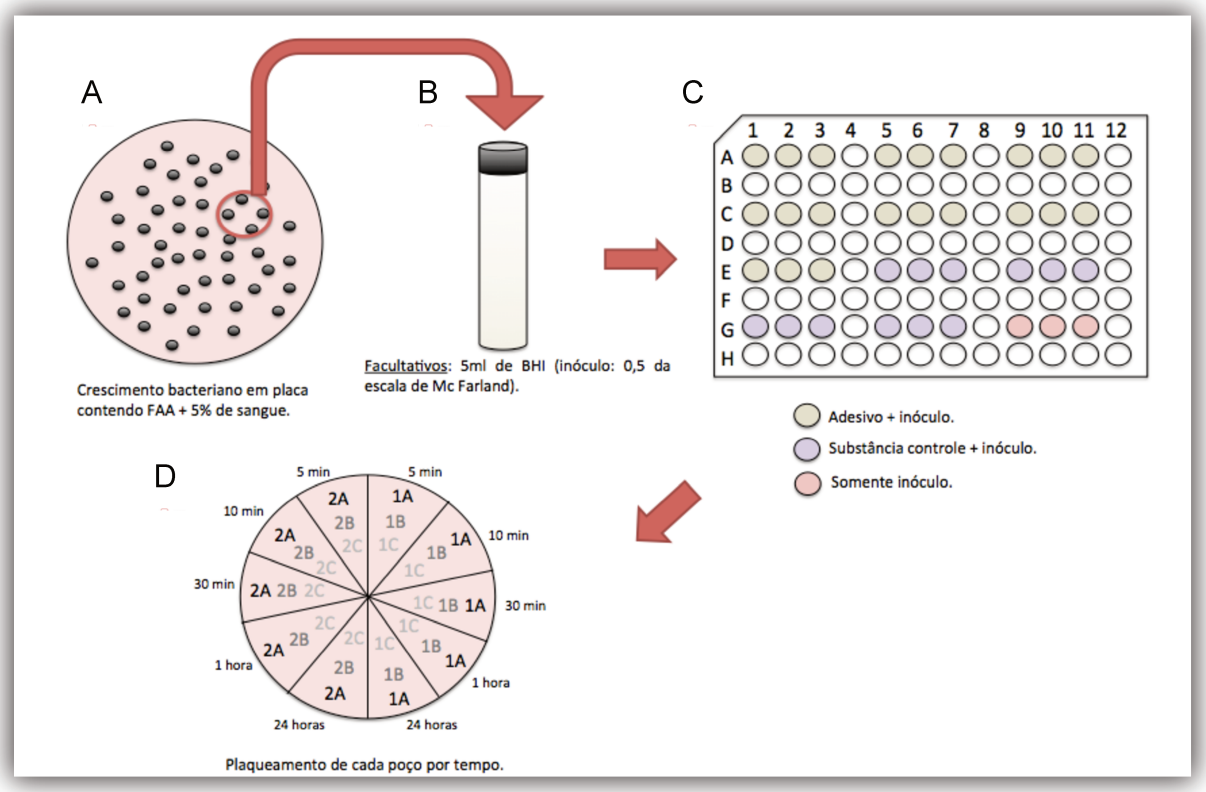

Figura 14. Determinação da atividade bactericida por contato. (A) Crescimento das espécies bacterianas facultativas. (B) Preparo do inóculo. (C) Disposição dos grupos em triplicata na placa de 96 poços. (D) Plaqueamento do inóculo por tempo, sendo os números os grupos e as letras as repetições.

Tabela 5. Grupos para a determinação da atividade bactericida por contato.

A	Gluma 2Bond (polimerizado)	Teste
B	Gluma Comfort Bond (polimerizado)	Controle negativo do A
C	*Primer* Clearfil SE Protect (polimerizado)	Teste
D	Clearfil SE Protect (polimerizado)	Teste
E	Clearfil SE Bond (polimerizado)	Controle negativo do D
F	Peak Universal Bond (polimerizado)	Teste
G	Peak LC Bond (polimerizado)	Controle negativo do F
H	Soro fisiológico	Controle negativo*
I	Digluconato de Clorexidina 2%	Controle positivo**
J	Digluconato de Clorexidina 0,2%	Controle positivo do F
K	Glutaraldeído 5%	Controle positivo do A
L	Inóculo	Controle negativo*

* Controle negativo para todos os grupos

** Controle positivo para todos os grupos

5. RESULTADOS:

5.1. Resistência de união:

Os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Média (desvio padrão) em função do adesivo e tempo de armazenamento (em MPa).

Adesivo	Tempo de armazenamento	
	24 horas	1 ano
Gluma 2Bond	43,1 (13,3) Aab	40,6 (10,8) Aab
Clearfil SE Protect	34,8 (11,5) Ab	37,9 (12,2) Ab
Peak Universal Bond	50,1 (10,6) Aa	49,8 (10,5) Aa

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Houve diferença significativa somente para o fator “adesivo” ($p=0,0019$). Não houve diferença estatística significante entre os tempos de armazenamento ($p=0,9715$) e a interação dos dois fatores ($p=0,7505$).

O Clearfil SE Protect apresentou o menor valor de resistência de união, em ambos os tempos de armazenamento, sem diferença estatística quando comparado ao adesivo Gluma 2Bond. Esse adesivo e o Peak Universal Bond também não apresentaram diferença estatística entre si. O armazenamento dos

espécimes por 1 ano não reduziu significantemente a resistência de união à dentina para nenhum dos adesivos testados.

5.2. Análise do Padrão de Fratura:

Após avaliação dos *stubs* metálicos em Microscopia Eletrônica de Varredura os seguintes resultados (Figura 15) foram obtidos:

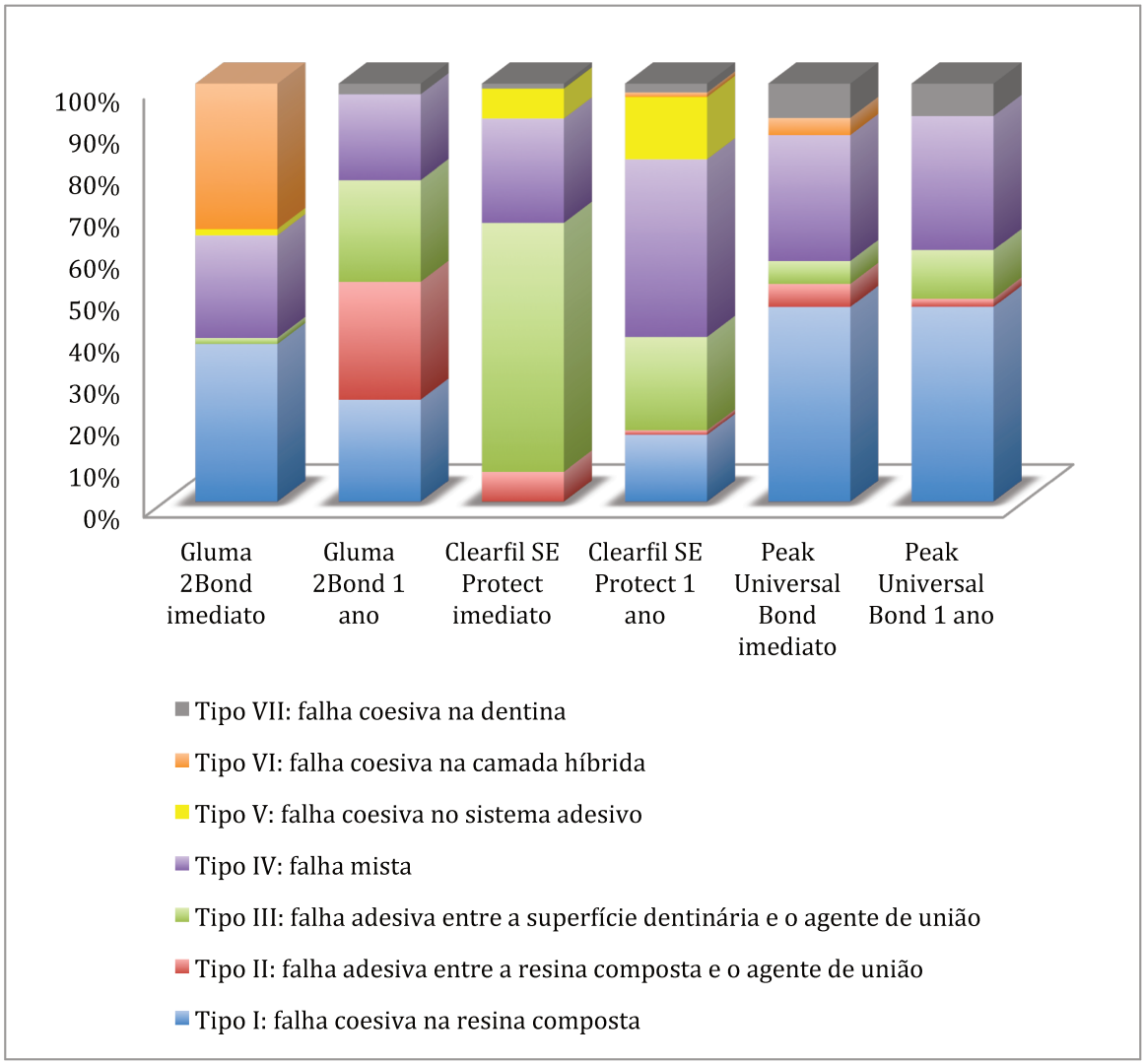

Figura 15. Gráfico de barras para o estudo do padrão de fratura dos adesivos, de acordo com o tempo de armazenamento.

O adesivo Gluma 2Bond (imediato) apresentou falha coesiva na resina composta (38%), falha coesiva na camada híbrida (35%) e falha mista (25%). Após armazenamento de um ano aumentaram-se as falhas adesivas entre a resina composta e o agente de união (totalizando 28%), e entre a superfície dentinária e o agente de união (totalizando 24%).

Para o Clearfil SE Protect (imediato) houve uma predominância da falha adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união (60%), seguidas da falha mista (25%), da falha adesiva entre a resina composta e o agente de união (7%), e da falha coesiva nos sistema adesivo (7%). Após um ano de armazenamento, as falhas mistas foram as mais predominantes (43%), assim como a falha adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união (22%). Houve um aumento significativo de falhas na resina composta.

O adesivo Peak Universal Bond (imediato) teve predominantemente falhas mistas (30%) e falhas coesivas na resina composta (47%). Após um ano de armazenamento, essas mesmas falhas continuaram predominantes (32% e 46% respectivamente) e houve um aumento da falha adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união.

Exemplos dos tipos de falhas mais encontrados para cada adesivo são apresentados a seguir (Figuras 16 a 21):

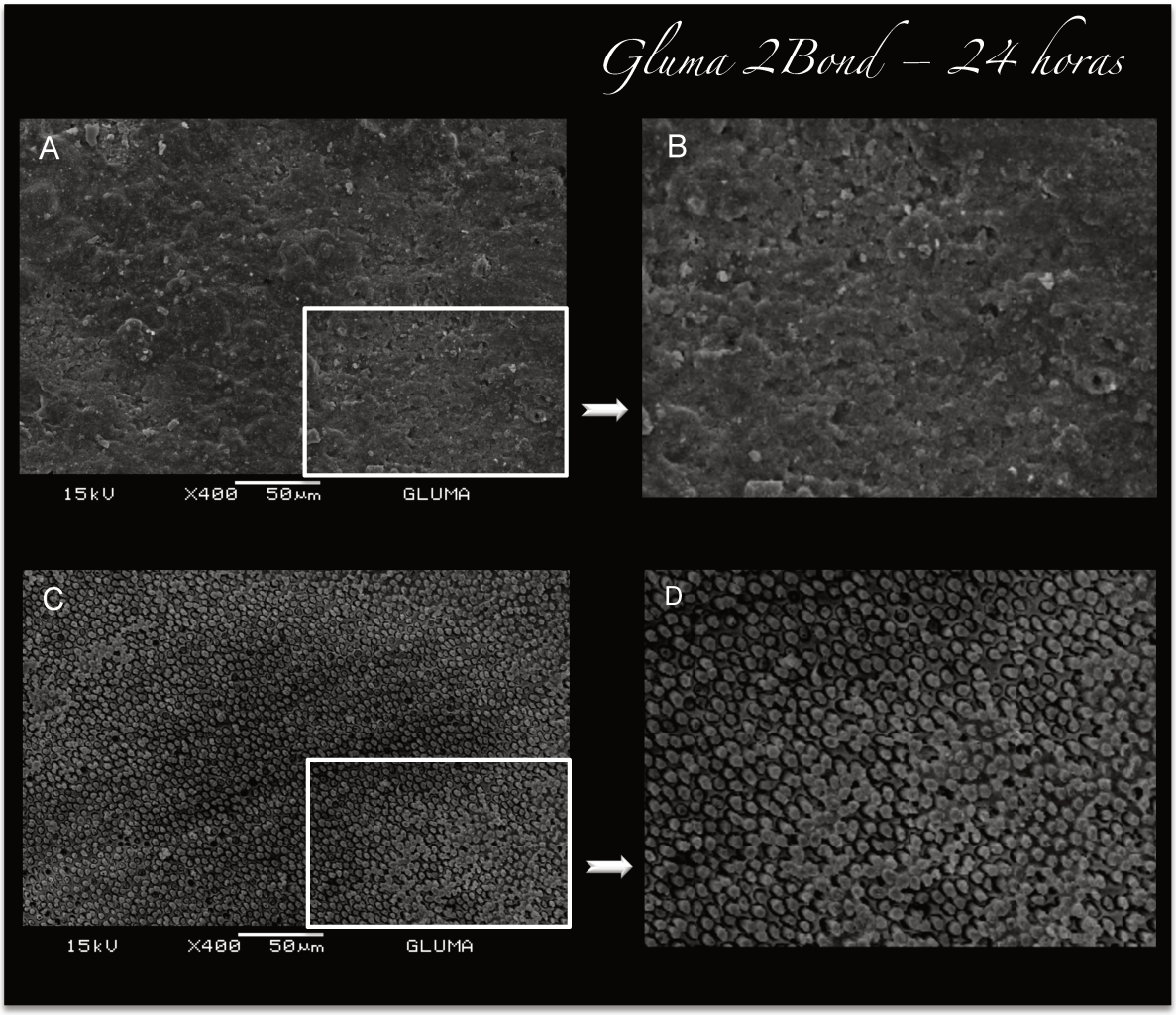

Figura 16. Padrão de fratura predominante para o adesivo Gluma 2Bond após 24 horas de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo I (coesiva em resina) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença de resina composta e suas partículas de carga). (C) Padrão de fratura do tipo VI (coesiva na camada híbrida) em um aumento de 400x. (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento (observa-se a presença dos *tags* resinosos no interior dos túbulos dentinários).

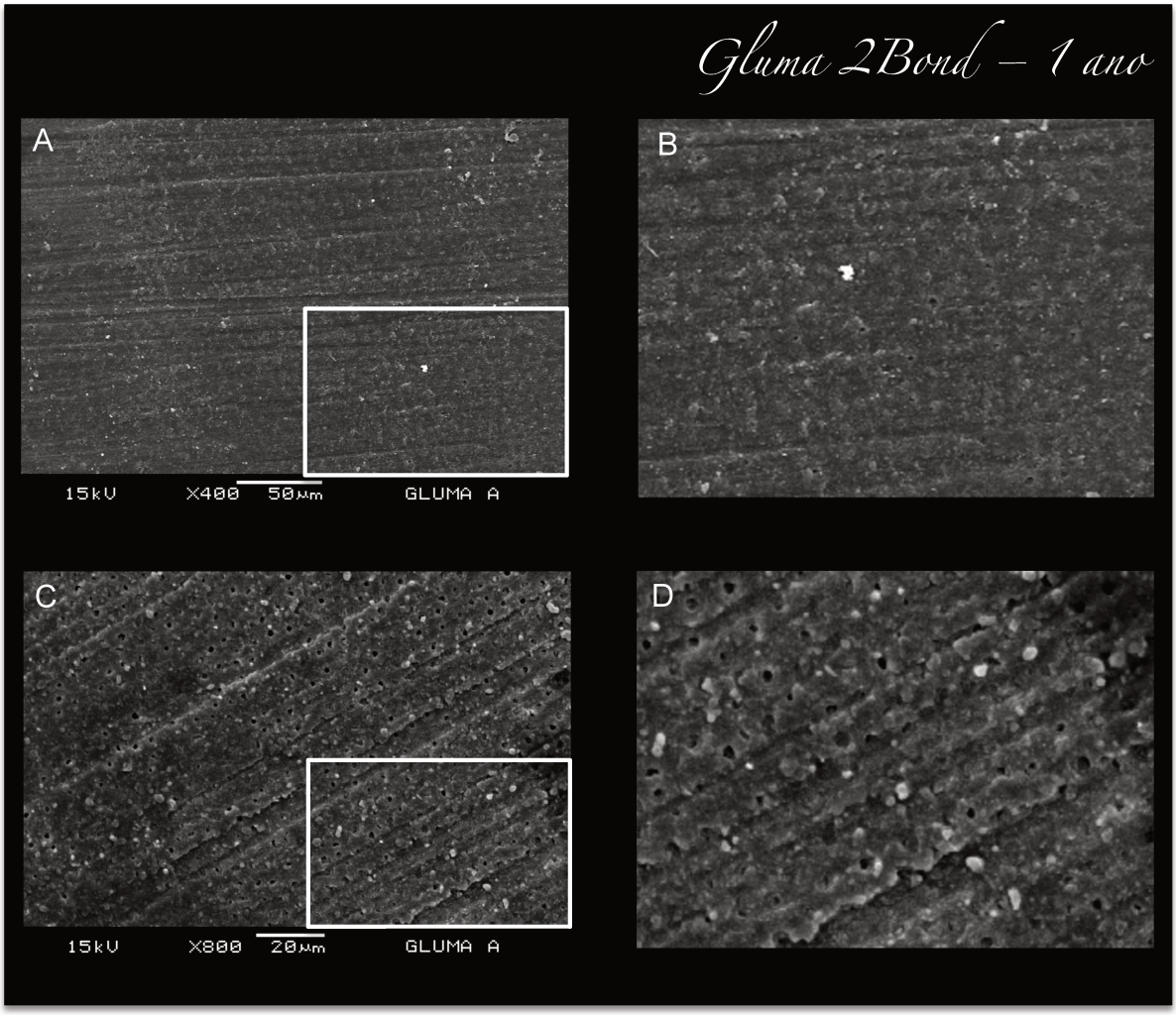

Figura 17. Padrão de fratura predominante para o adesivo Gluma 2Bond após 1 ano de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo II (adesiva entre a resina composta e o agente de união) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença do agente de união cobrindo os túbulos dentinários, assim como as ranhuras provocadas pela lixa de SiC # 600). (C) Padrão de fratura do tipo III (adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união) em um aumento de 400x. (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento (observa-se a presença da embocadura dos túbulos dentinários e as ranhuras provocadas pela lixa de SiC # 600).

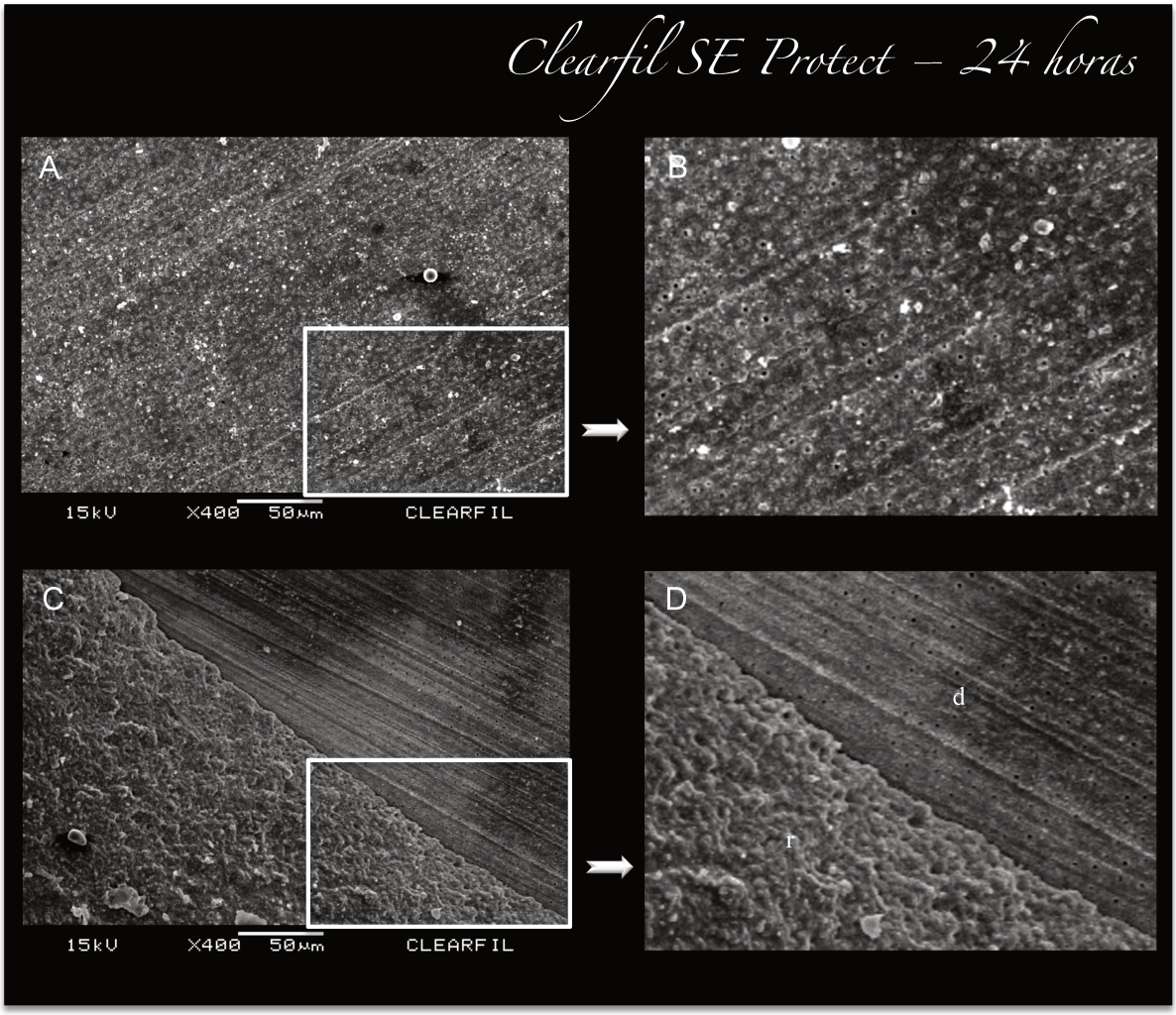

Figura 18. Padrão de fratura predominante para o adesivo Clearfil SE Protect após 24 horas de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo III (adesiva entre o agente de união e o substrato dentinário) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença da embocadura dos túbulos dentinários e as ranhuras provocadas pela lixa de SIC # 600). (C) Padrão de fratura do tipo IV (mista) em um aumento de 400x. (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento (observa-se a presença de falha coesiva em resina (r), caracterizada pela presença de resina e falha adesiva entre o substrato dentinário e o agente de união (d), caracterizada pela presença da embocadura dos túbulos dentinários e as ranhuras provocadas pela lixa de SIC # 600).

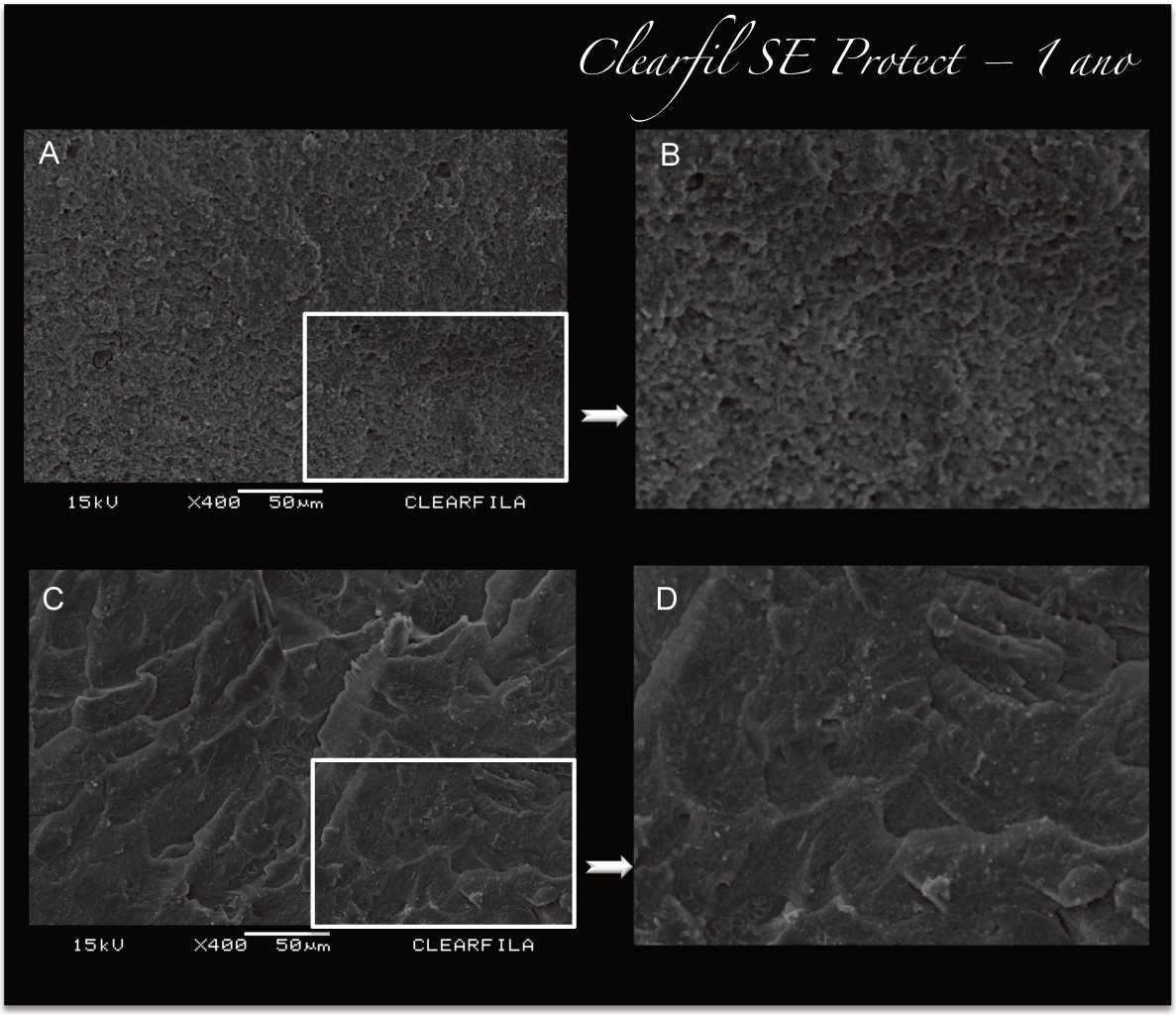

Figura 19. Padrão de fratura predominantes (posteriores ao tipo III e tipo IV) para o adesivo Clearfil SE Protect após 1 ano de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo I (coesiva em resina) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença de resina composta e suas partículas de carga). (C) Padrão de fratura do tipo V (coesiva no sistema adesivo) em um aumento de 400x. (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento (observa-se a delaminação da camada do sistema adesivo).

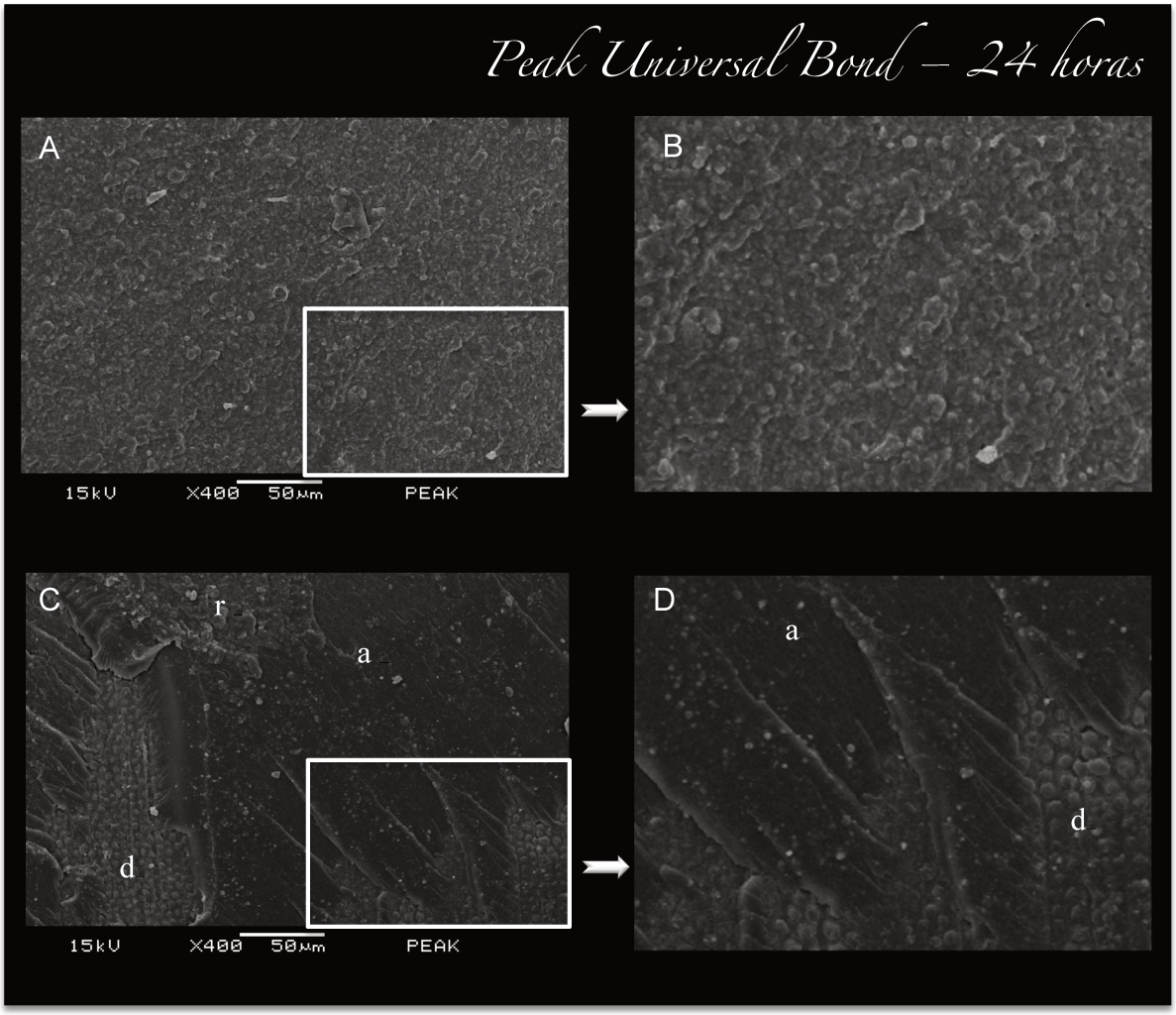

Figura 20. Padrão de fratura predominante para o adesivo Peak Universal Bond após 24 horas de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo I (coesiva em resina) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença de resina composta e suas partículas de carga). (C) Padrão de fratura do tipo IV (mista) em um aumento de 400x (observa-se a presença de resina composta (r), sistema adesivo (a) e dentina (d) com os túbulos dentinários obliterados). (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento.

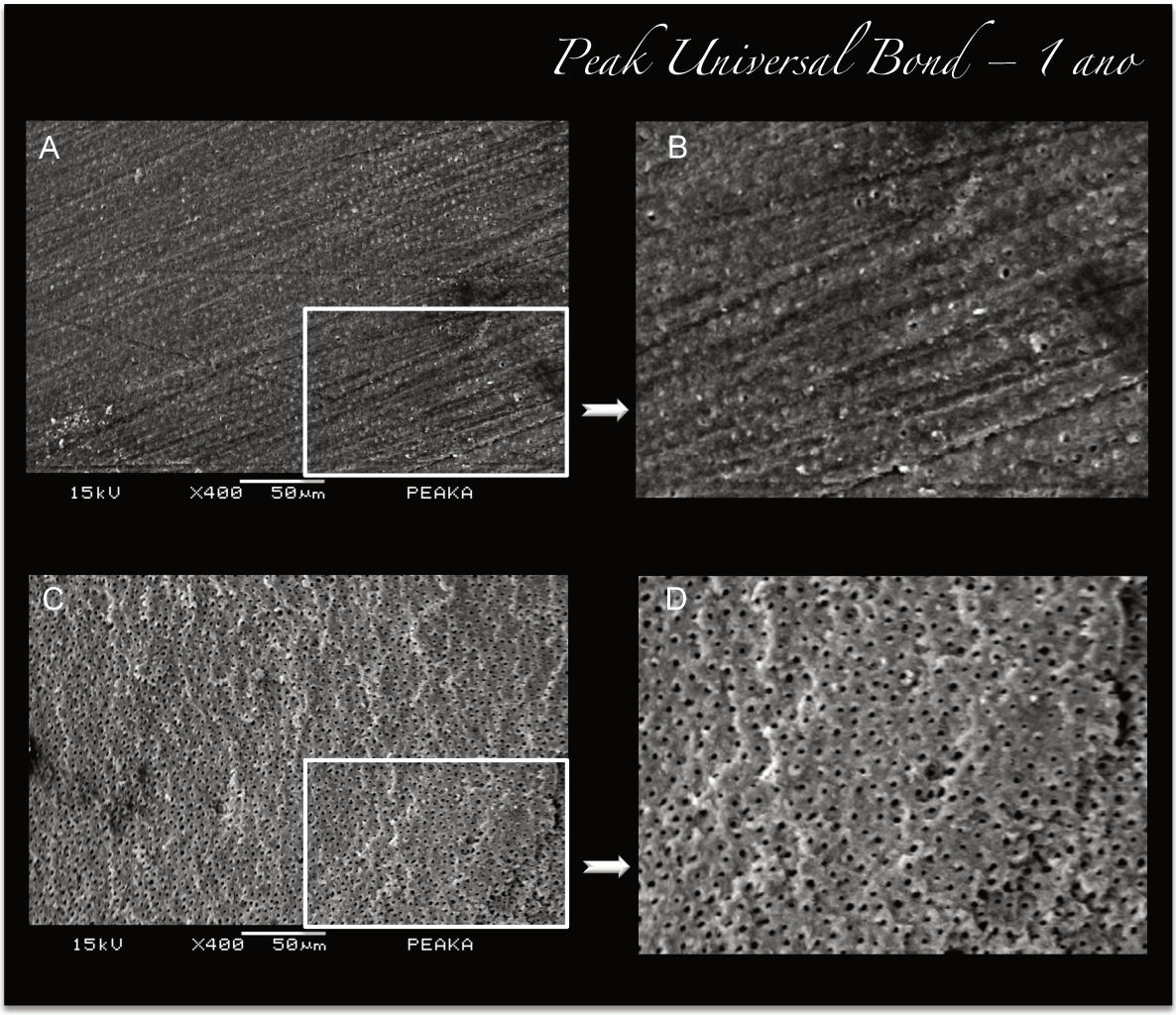

Figura 21. Padrão de fratura predominante (posteriores ao tipo I e tipo IV) para o adesivo Peak Universal Bond após 1 ano de armazenamento. (A) Padrão de fratura do tipo III (adesiva entre a superfície dentinária e o agente de união) em um aumento de 400x. (B) Região selecionada da imagem A em maior aumento (observa-se a presença da embocadura dos túbulos dentinários e as ranhuras provocadas pela lixa de SiC # 600). (C) Padrão de fratura do tipo VII (coesiva na dentina) em um aumento de 400x. (D) Região selecionada da imagem C em maior aumento (observa-se a presença de dentina fraturada de modo irregular).

5.3. Análise da Área de União Dentina-Sistema Adesivo:

Após a análise da interface dentina-sistema adesivo em Microscopia eletrônica de Varredura, as seguintes imagens foram obtidas:

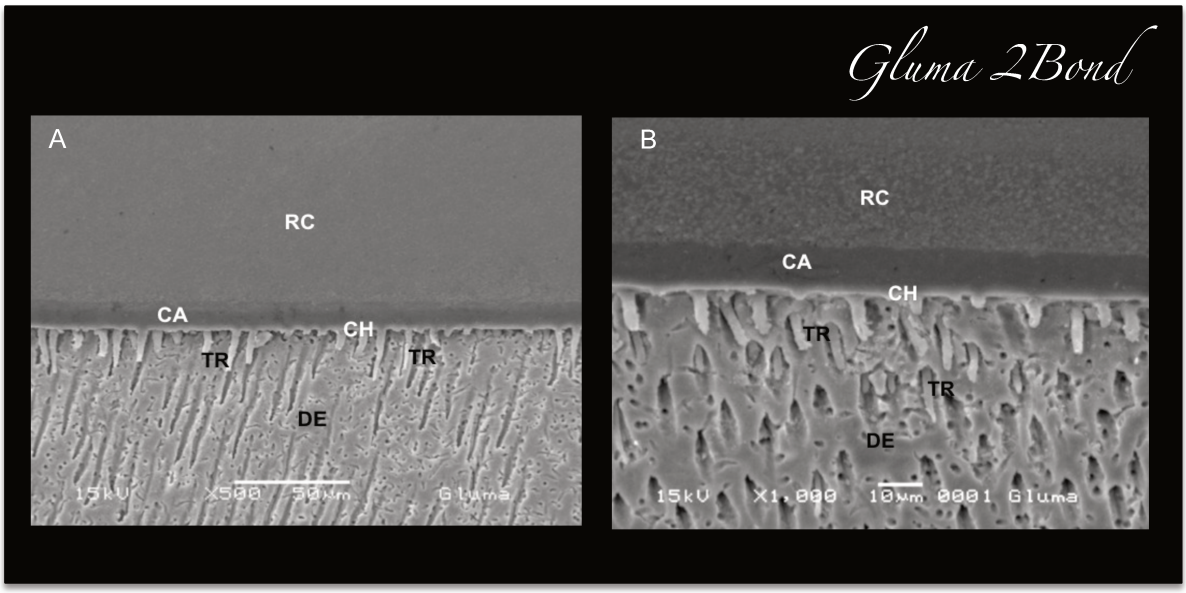

Figura 22. Interface adesiva para o adesivo Gluma 2Bond. (A) Aumento de 500x (RC: resina composta, CA: camada de adesivo, CH: camada híbrida, TR: *tag* de resina, DE: dentina). (B) Aumento de 1000x.

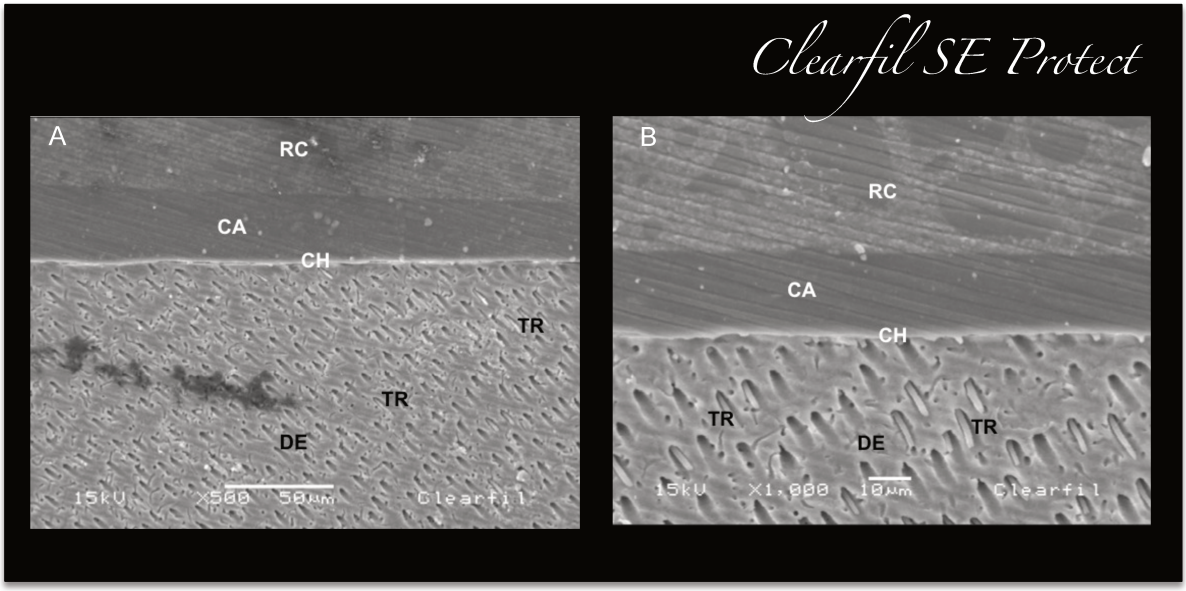

Figura 23. Interface adesiva para o adesivo Clearfil SE Protect. (A) Aumento de 500x (RC: resina composta, CA: camada de adesivo, CH: camada híbrida, TR: *tag* de resina, DE: dentina). (B) Aumento de 1000x.

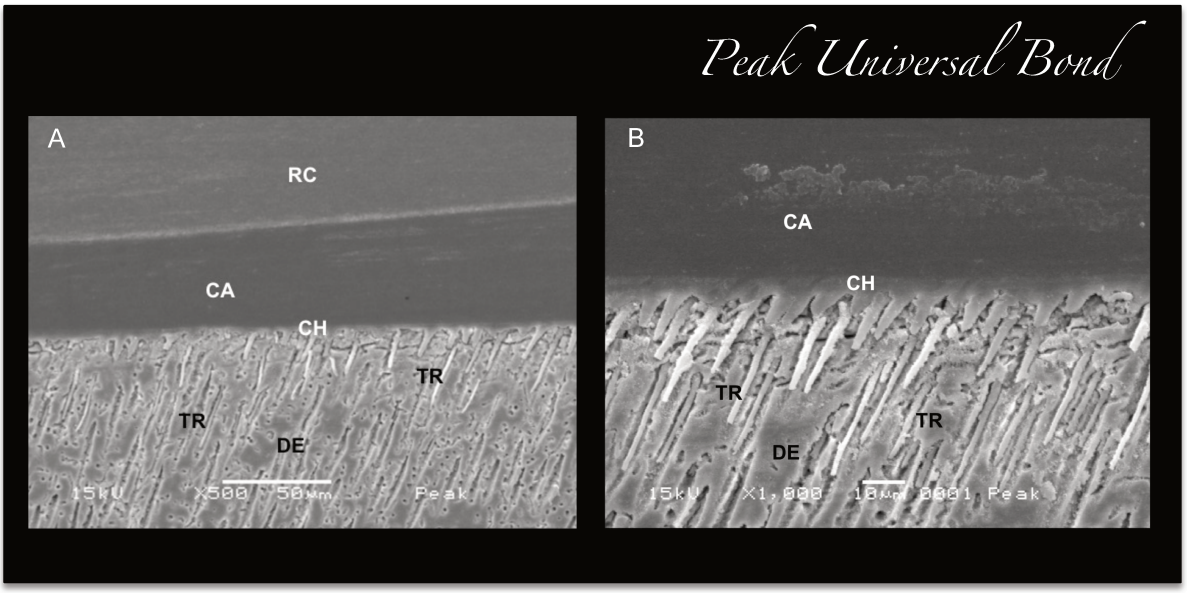

Figura 24. Interface adesiva para o adesivo Peak Universal Bond. (A) Aumento de 500x (RC: resina composta, CA: camada de adesivo, CH: camada híbrida, TR: *tag* de resina, DE: dentina). (B) Aumento de 1000x.

As Figuras 22 a 24 são representativas das áreas de união dentina-adesivo-resina composta para os três adesivos. É possível verificar a presença de camada híbrida e *tags* de resina para todos os adesivos. O Clearfil SE Protect apresentou camada híbrida mais fina com curtos *tags* de resina (Figura 23), quando comparado ao Gluma 2Bond (Figura 22) e o Peak Universal Bond (Figura 24), que são adesivos convencionais (condicionamento com ácido fosfórico). O Peak Universal Bond apresentou maior quantidade de *tags* de resina, assim como camada híbrida mais espessa.

5.4. Halo de Inibição:

Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 7 (em mm) e as imagens dos halos nas Figuras 25 a 28.

Tabela 7. Mediana (valor mínimo e máximo) do halo de inibição em função do tratamento e da bactéria.

Grupo	Bactéria			
	Enterococcus faecalis	*Lactobacillus casei*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus mutans*
Gluma 2Bond (polimerizado)	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab
Gluma 2Bond (não polimerizado)	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab
Gluma Confort Bond (polimerizado)	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab
Primer Clearfil SE Protect (polimerizado)	5.46 (5.17; 5.78) Aab	5.26 (4.71; 5.80) Aab	5.74 (5.59;6.67)Aab	4.21 (3.84;4.44)Aab
Primer Clearfil SE Protect (não polimerizado)	5.87 (5.83;6.09)Aab	7.12 (6.71;7.38)Aab	6.40 (5.71;6.87)Aab	5.73 (4.90;5.82)Aab
Clearfil SE Protect (polimerizado)	2.78 (1.53;3.43)ABab	5.24 (4.85;6.33)ABab	5.55 (5.33;5.80)Aab	1.24 (0.00;2.12)Bab
Clearfil SE Protect (não polimerizado)	1.95 (1.91;4.47)Aab	2.05 (1.88;2.46)Aab	5.35 (4.43;5.48)Aab	2.01 (1.71;2.17)Aab
Clearfil SE Bond (polimerizado)	2.08 (1.90;2.16)Bab	3.68 (3.29;3.83)ABab	5.66 (5.56;6.83)Aab	3.21 (3.16;3.56)ABab
Peak Universal Bond (polimerizado)	0.00 (0.00;0.00)Ab	1.23 (1.15;1.28)Aab	0.00 (0.00;0.00)Ab	1.68 (1.43;2.02)Aab
Peak Universal Bond (não polimerizado)	0.94 (0.68;1.21)Aab	0.57 (0.34;0.90)Aab	0.69 (0.51;0.75)Aab	0.88 (0.64;1.09)Aab
Peak LC Bond (polimerizado)	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab
Soro Fisiológico	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab	0.00 (0.00;0.00)Ab
Clorexidina 2%	7.02 (6.79;7.55)ABab	14.90 (14.39;15.33)Aa	8.69 (8.04;8.95)ABab	6.42 (6.34;6.45)Bab
Clorexidina 0,2%	5.34 (4.59;5.36)Bab	12.51 (12.02;15.07)Aa	6.93 (6.74;7.04)ABab	5.68 (4.72;5.68)ABab
Glutaraldeído 5%	8.01 (7.51;8.30)Ba	9.61 (8.07;10.27)ABab	13.71 (13.54;14.88)Aa	10.08 (10.02;10.26)ABa

Medianas seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si (p≤0.05)

O adesivo Gluma 2Bond não apresentou halo de inibição, tanto polimerizado como não polimerizado, para as quatro bactérias facultativas. O seu grupo controle (Gluma Confort Bond) também não apresentou halo de inibição. Já o glutaraldeído 5% apresentou halo de inibição para as quatro bactérias facultativas e foi estatisticamente diferente dos adesivos Peak LC Bond, Gluma 2Bond e Comfort Bond, exceto para a bactéria *Lactobacillus casei*. Não houve diferença estatística entre o Gluma 2Bond polimerizado, não polimerizado e o seu controle negativo. Entre as bactérias, para esses grupos, também não há diferença estatística.

O Clearfil SE Protect apresentou halos de inibição tanto polimerizado quanto não polimerizado. O *primer* do Clearfil SE Protect quando isolado também apresentou halos, polimerizado ou não. O seu grupo controle (Clearfil SE Bond) também apresentou halos de inibição. Não foram obtidas diferenças estatísticas entre esses 5 grupos, e também, quando comparados à clorexidina 2%.

O Peak Universal Bond polimerizado apresentou halo de inibição somente para as bactérias *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans.* Quando não polimerizado, apresentou halo para todas as bactérias facultativas. O seu grupo controle (Peak LC Bond) não apresentou halo de inibição e a clorexidina 0,2% apresentou halo para todas as bactérias facultativas. Não houve diferença estatística entre o Peak Universal Bond polimerizado, não polimerizado e o Peak LC Bond. Não obtendo diferença estatística também quando comparados à clorexidina 0,2%, exceto o Peak LC Bond para o *Lactobacillus casei.*

O soro fisiológico, como já esperado, não presentou halo de inibição. Já a clorexidina, nas duas concentrações, apresentou halo para todas as bactérias facultativas.

Dentre os adesivos que apresentaram halo de inibição, os grupos *Primer* do Clearfil SE Protect polimerizado, *Primer* do Clearfil SE Protect não polimerizado, Clearfil SE Protect não polimerizado, Peak Universal Bond polimerizado, Peak Universal Bond não polimerizado e Peak LC Bond polimerizado, não apresentaram diferença estatística entre as bactérias. Para o Clearfil SE Protect polimerizado, o microorganismo *Streptococcus mutans* apresentou menor valor de halo de inibição que o Staphylococus aureus. O Clearfil SE Bond polimerizado apresentou menor valor para o *Enterococcus faecalis* quando comparado ao *Staphylococus aureus.*

Para os grupos controles positivos, o digluconato de clorexidina 2% apresentou menor valor para o *Streptococcus mutans* quando comparado ao microorganismo Lactobacillus casei. O digluconato de clorexidina 0,2% e o glutaraldeído apresentaram menor valor de halo de inibição para a bactéria *Enterococcus faecalis* quando comparado ao *Lactobacillus casei* e *Staphylococus aureus*, respectivamente.

Para os microorganismos *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus,* o glutaraldeído resultou em maior halo de inibição apenas comparado com o adesivo Peak Universal Bond e o Peak LC Bond polimerizados. Para os adesivos Gluma 2Bond, Clearfil SE Protect e Peak Universal Bond não houve diferença estatística quando polimerizados ou não.

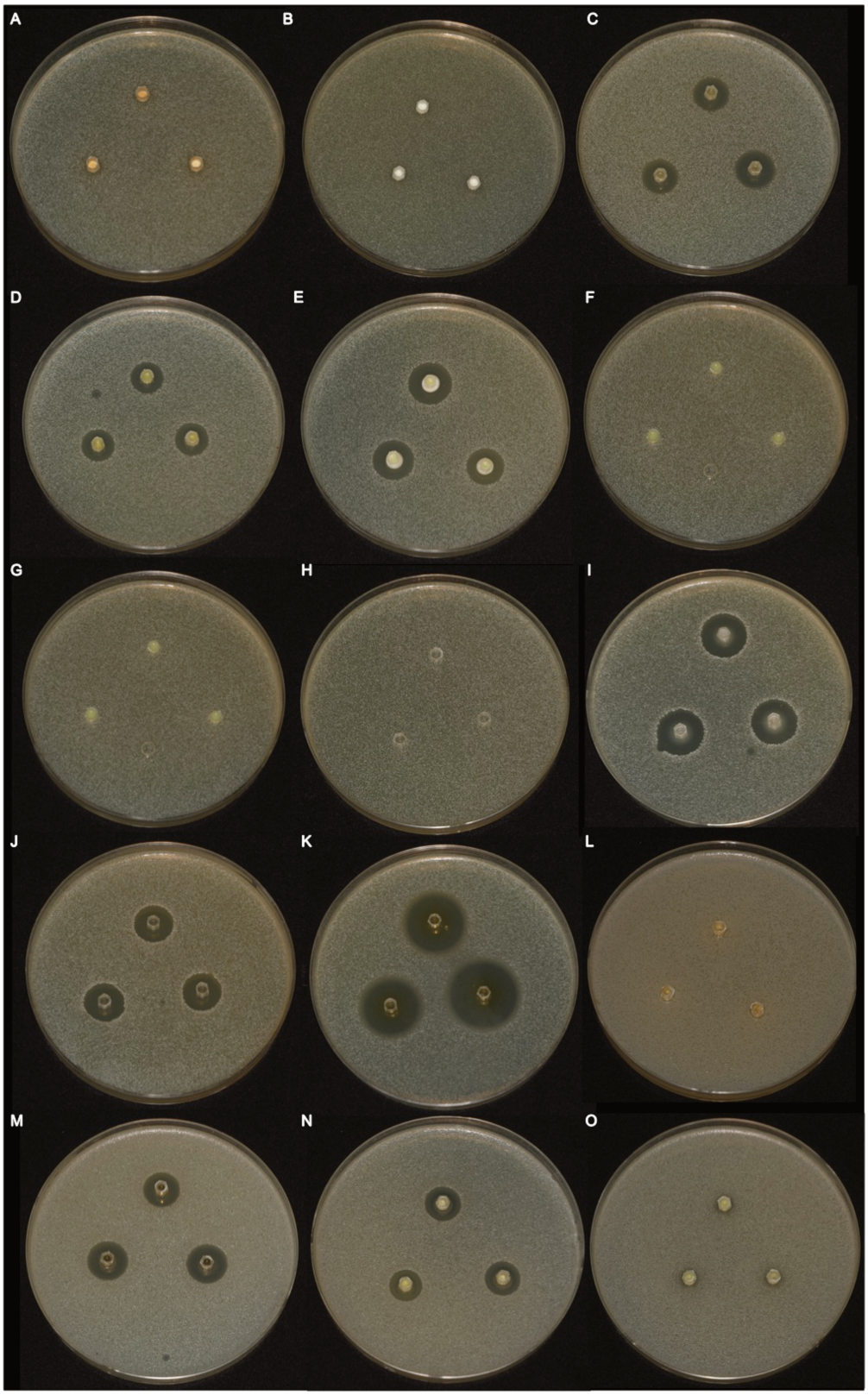

Figura 25. Halo de inibição para a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). (A) Gluma 2Bond. (B) Gluma Comfort Bond. (C) *Primer* do Clearfil SE Protect. (D) Clearfil SE Protect. (E) Clearfil SE Bond. (F) Peak Universal Bond. (G) Peak LC Bond. (H) Soro fisiológico. (I) Digluconato de Clorexidina 2%. (J) Digluconato de Clorexidina 0,2%. (K) Glutaraldeído 5%. (L) Gluma 2Bond não fotoativado. (M) *Primer* do Clearfil SE Bond não fotoativado. (N) Clearfil SE Bond não fotoativado. (O) Peak Universal Bond não fotoativado.

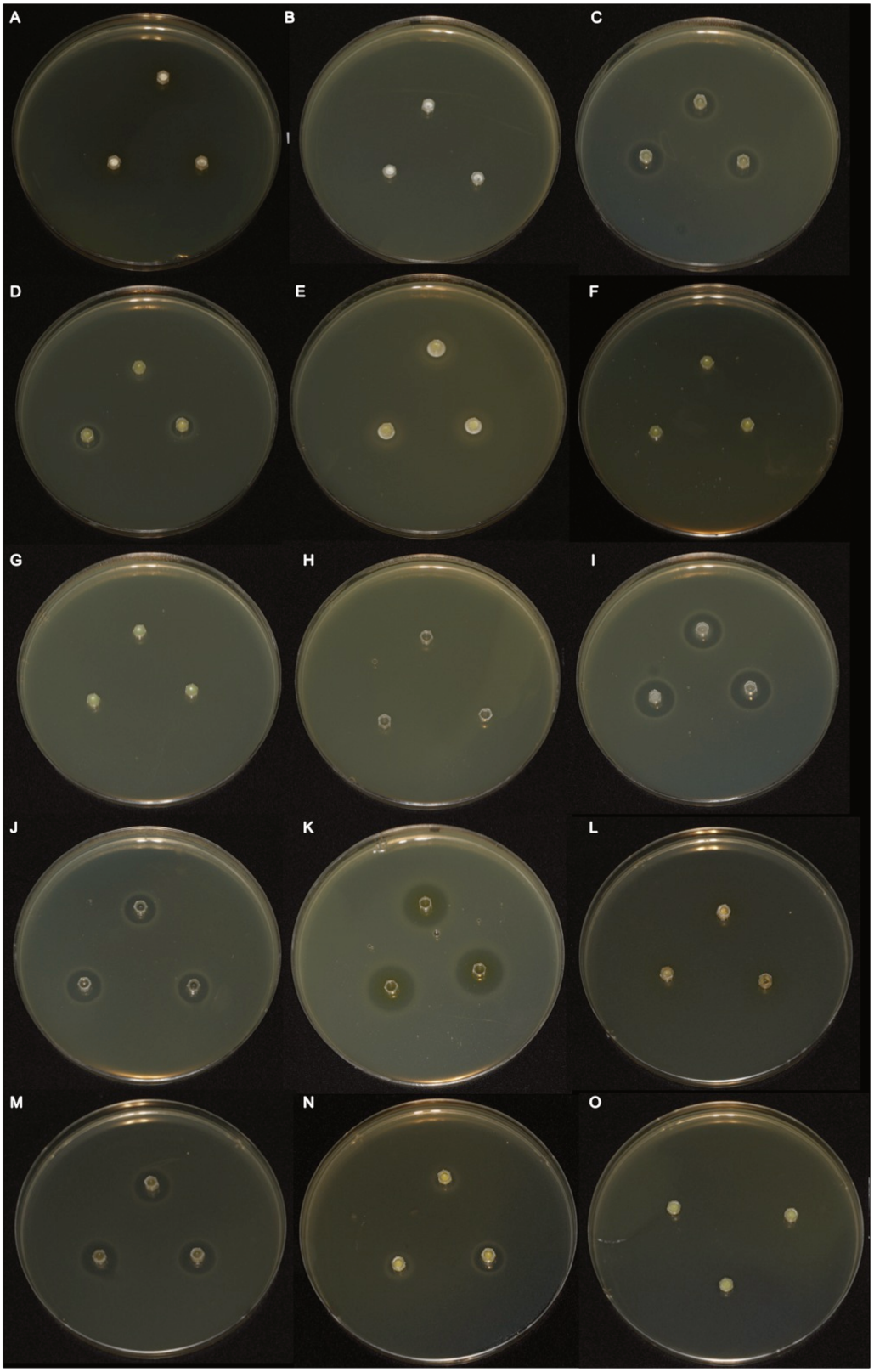

Figura 26. Halo de inibição para a bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). (A) Gluma 2Bond. (B) Gluma Comfort Bond. (C) *Primer* do Clearfil SE Protect. (D) Clearfil SE Protect. (E) Clearfil SE Bond. (F) Peak Universal Bond. (G) Peak LC Bond. (H) Soro fisiológico. (I) Digluconato de Clorexidina 2%. (J) Digluconato de Clorexidina 0,2%. (K) Glutaraldeído 5%. (L) Gluma 2Bond não fotoativado. (M) *Primer* do Clearfil SE Bond não fotoativado. (N) Clearfil SE Bond não fotoativado. (O) Peak Universal Bond não fotoativado.

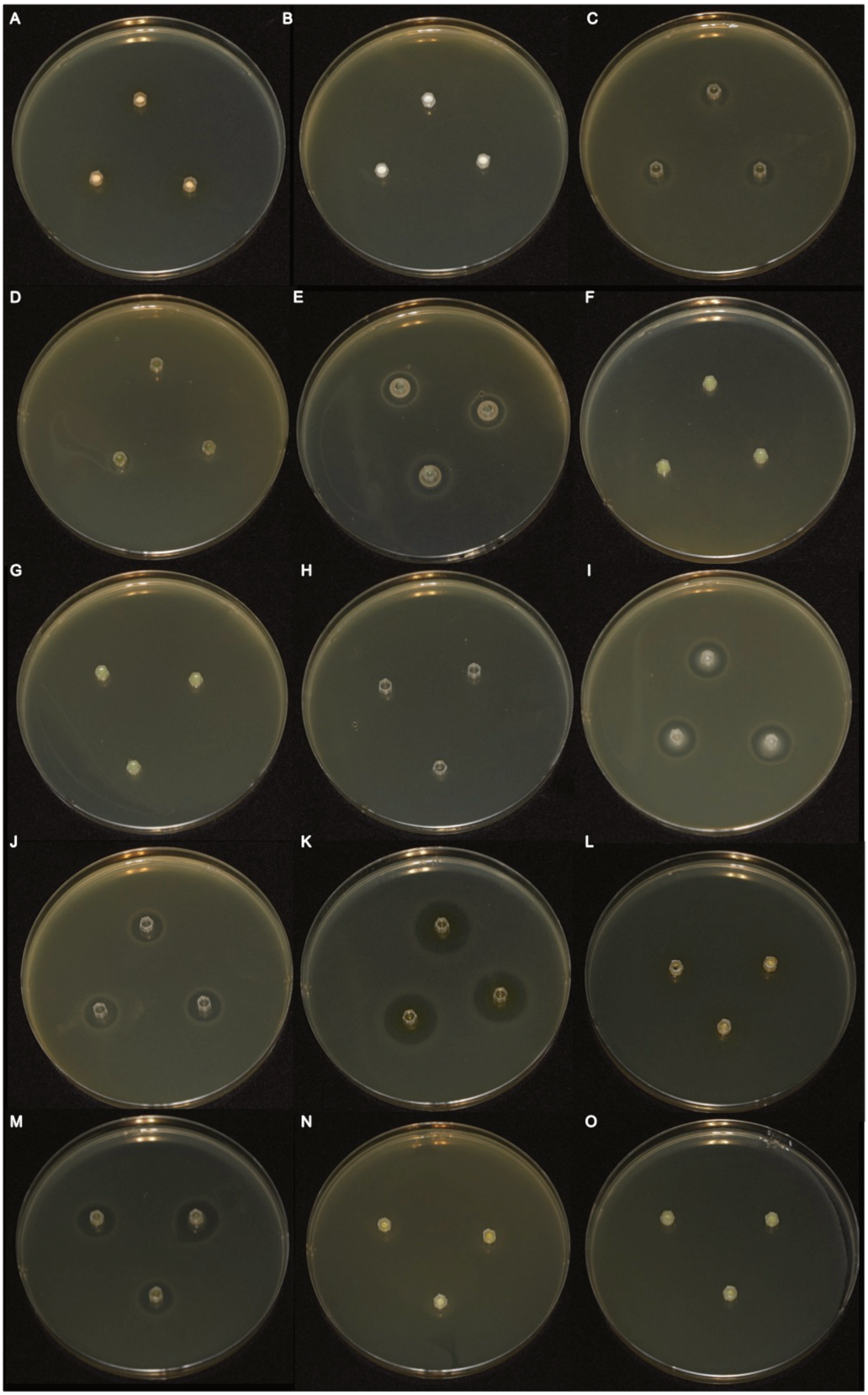

Figura 27. Halo de inibição para a bactéria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). (A) Gluma 2Bond. (B) Gluma Comfort Bond. (C) *Primer* do Clearfil SE Protect. (D) Clearfil SE Protect. (E) Clearfil SE Bond. (F) Peak Universal Bond. (G) Peak LC Bond. (H) Soro fisiológico. (I) Digluconato de Clorexidina 2%. (J) Digluconato de Clorexidina 0,2%. (K) Glutaraldeído 5%. (L) Gluma 2Bond não fotoativado. (M) *Primer* do Clearfil SE Bond não fotoativado. (N) Clearfil SE Bond não fotoativado. (O) Peak Universal Bond não fotoativado.

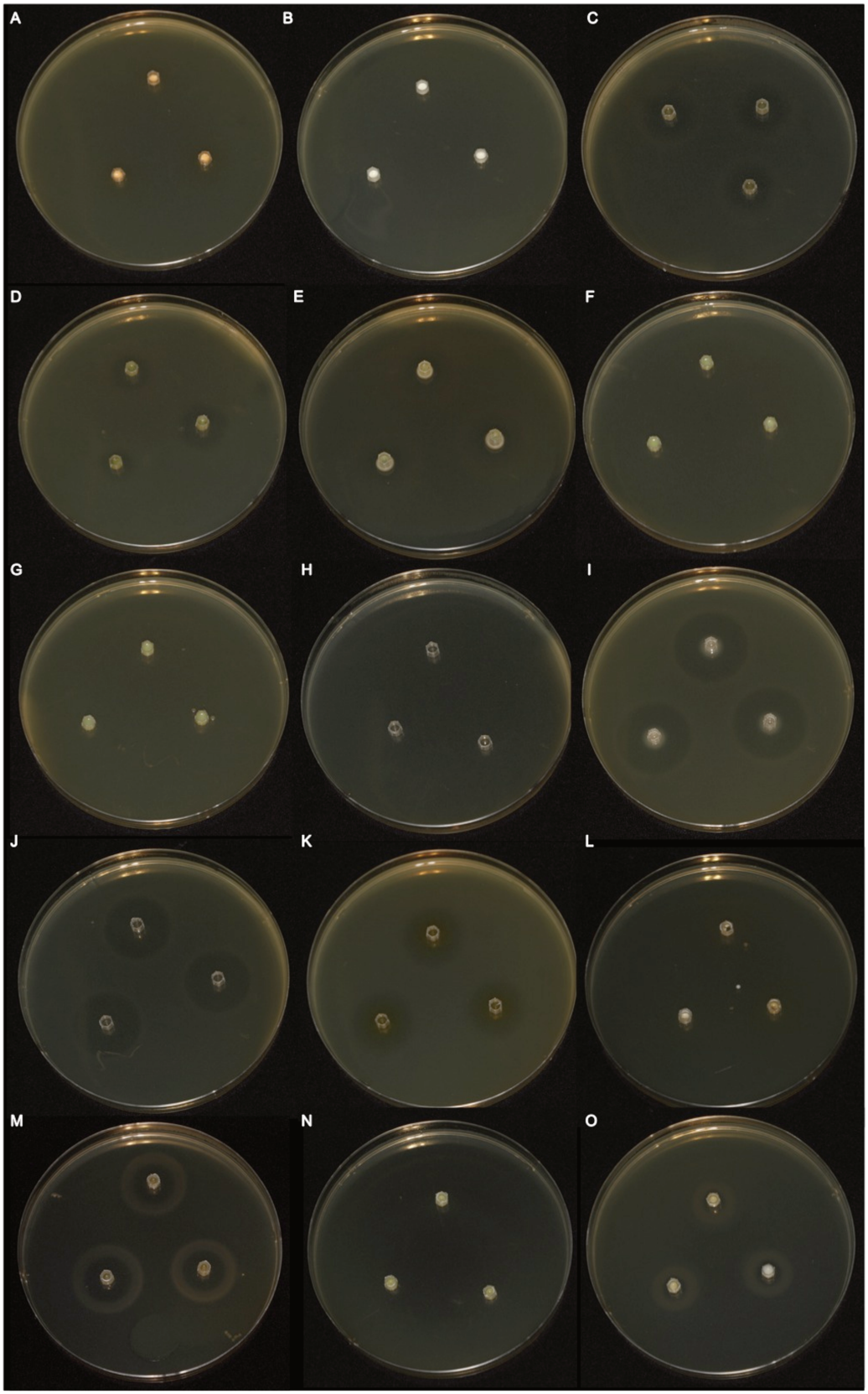

Figura 28. Halo de inibição para a bactéria *Lactobacillus casei* (ATCC L324M). (A) Gluma 2Bond. (B) Gluma Comfort Bond. (C) *Primer* do Clearfil SE Protect. (D) Clearfil SE Protect. (E) Clearfil SE Bond. (F) Peak Universal Bond. (G) Peak LC Bond. (H) Soro fisiológico. (I) Digluconato de Clorexidina 2%. (J) Digluconato de Clorexidina 0,2%. (K) Glutaraldeído 5%. (L) Gluma 2Bond não fotoativado. (M) *Primer* do Clearfil SE Bond não fotoativado. (N) Clearfil SE Bond não fotoativado. (O) Peak Universal Bond não fotoativado.

5.5. Determinação da Atividade Bactericida por Contato:

Para a determinação da atividade bactericida por contato foi verificado o crescimento bacteriano ou não. Quando não houve crescimento bacteriano (+) o adesivo foi considerado bactericida. Os resultados estão descritos nas Tabelas 8 a 11.

Tabela 8. Atividade bactericida para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

	5 min	10 min	30 min	1 hora	24 horas
Gluma 2Bond	-	-	-	-	+
Gluma Comfort Bond	-	-	-	-	+
Primer Clearfil SE Protect	-	-	+	+	+
Clearfil SE Protect	-	-	-	-	+
Clearfil SE Bond	-	-	-	-	-
Peak Universal Bond	-	-	-	-	-
Peak LC Bond	-	-	-	-	-
Soro Fisiológico	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	+	+	+	+	+
Clorexidina 0,2%	+	+	+	+	+
Glutaraldeído 5%	+	+	+	+	+
Inóculo	-	-	-	-	-

Para o *Staphylococcus aureus* apenas os adesivos Gluma 2Bond, Gluma Comfort Bond e o Clearfil SE Protect foram bactericidas após 24 horas. O *primer* do Clearfil SE Protect foi bactericida após 30 min, 1 hora e 24 horas. As soluções de clorexidina e glutaraldeído inibiram o crescimento bacteriano em todos os tempos estudados e para todas as bactérias utilizadas.

Tabela 9. Atividade bactericida para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

	5 min	10 min	30 min	1 hora	24 horas
Gluma 2Bond	-	-	-	-	+
Gluma Comfort Bond	-	-	-	-	+
Primer Clearfil SE Protect	-	-	+	+	+
Clearfil SE Protect	-	-	-	-	-
Clearfil SE Bond	-	-	-	-	-
Peak Universal Bond	-	-	-	-	-
Peak LC Bond	-	-	-	-	-
Soro Fisiológico	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	+	+	+	+	+
Clorexidina 0,2%	+	+	+	+	+
Glutaraldeído 5%	+	+	+	+	+
Inóculo	-	-	-	-	-

Para o *Enterococcus faecalis* o Gluma 2Bond e o Gluma Comfort Bond foram bactericida após 24 horas e o *primer* do Clearfil SE Protect foi bactericida após 30 min, 1 hora e 24 horas de contato com o inóculo.

Tabela 10. Atividade bactericida para *Lactobacillus casei* (ATCC L324M).

	5 min	10 min	30 min	1 hora	24 horas
Gluma 2Bond	-	-	-	-	+
Gluma Comfort Bond	-	-	-	-	+
Primer Clearfil SE Protect	-	-	-	+	+
Clearfil SE Protect	-	-	-	-	+
Clearfil SE Bond	-	-	-	-	-
Peak Universal Bond	-	-	-	-	-
Peak LC Bond	-	-	-	-	-
Soro Fisiológico	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	+	+	+	+	+

Clorexidina 0,2%	+	+	+	+	+
Glutaraldeído 5%	+	+	+	+	+
Inóculo	-	-	-	-	-

Para o *Lactobacillus casei* o Gluma 2Bond e o Gluma Comfort Bond também foram bactericidas após 24 horas. O *primer* do Clearfil SE Protect foi bactericida somente após 1 hora e 24 horas de contato, e o Clearfil SE Protect foi bactericida após 24 horas.

Tabela 11. Atividade bactericida para *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

	5 min	10 min	30 min	1 hora	24 horas
Gluma 2Bond	-	-	-	-	+
Gluma Comfort Bond	-	-	-	-	+
Primer Clearfil SE Protect	-	-	+	+	+
Clearfil SE Protect	-	-	+	+	+
Clearfil SE Bond	-	-	-	-	-
Peak Universal Bond	-	-	-	-	-
Peak LC Bond	-	-	-	-	-
Soro Fisiológico	-	-	-	-	-
Clorexidina 2%	+	+	+	+	+
Clorexidina 0,2%	+	+	+	+	+
Glutaraldeído 5%	+	+	+	+	+
Inóculo	-	-	-	-	-

Para o *Streptococcus mutans* o Gluma 2Bond e o Gluma Comfort Bond também foram bactericidas após 24 horas de contato com o inóculo. O *primer* do Clearfil SE Protect e o Clearfil SE Protect foram bactericidas após 30 min, 1 hora e 24 horas de contato com o inóculo.

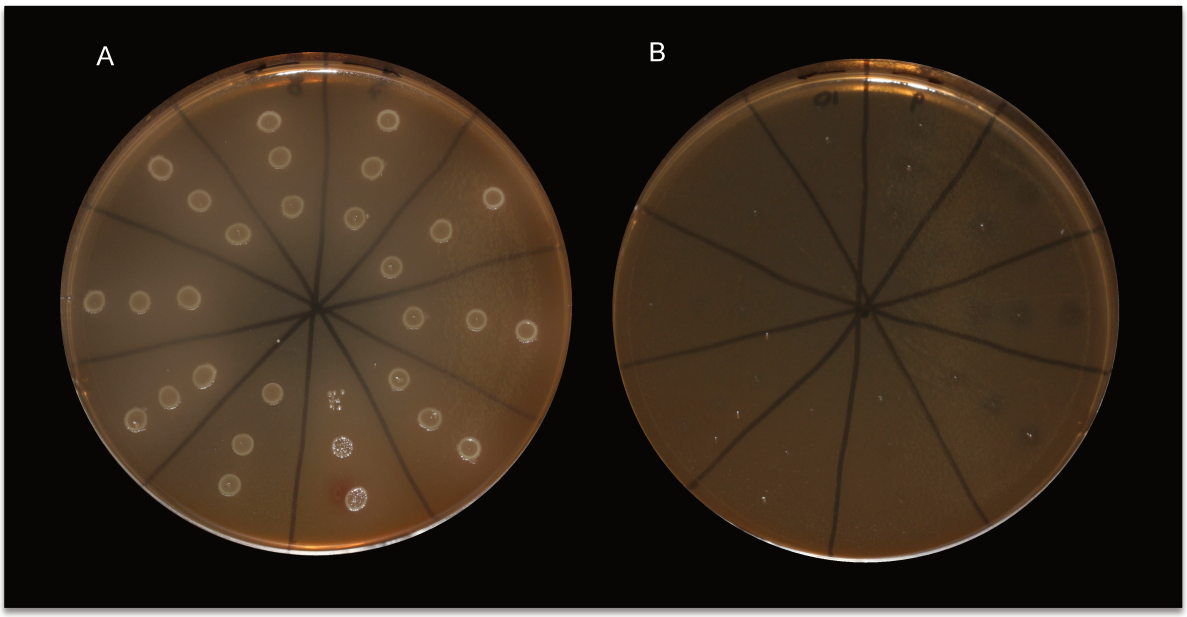

Figura 29. Verificação visual do crescimento bacteriano após 24 horas do plaqueamento no inóculo (de acordo com o tempo de contato do inóculo com a substância testada). (A) Crescimento bacteriano para todos os tempos, indicando que a substância não foi bactericida para nenhum dos tempos testados. (B) Sem crescimento bacteriano, indicando que a substância foi bactericida.

6. DISCUSSÃO

A cárie recorrente é uma das principais causas de insucesso das restaurações. Os subprodutos ácidos bacterianos podem infiltrar não somente na área de união ou *gap*, mas também nos tecidos dentais adjacentes à restauração, criando uma zona marginal desmineralizada, e assim, facilitando a formação do processo carioso (Fontana & Gonzales-Cabezas , 2000; Kidd *et al.,*1992; Kidd, 2001; Li *et al.,* 2010). A incorporação de agentes antimicrobianos nos sistemas adesivos tem sido descrita como benéfica aos procedimentos restauradores (Shinohara *et al.*, 2006; Carrilho *et al.*, 2007). A presença desses agentes antimicrobianos na formulação dos sistemas adesivos pode ser uma alternativa para a prevenção da cárie recorrente, pois impede a colonização e o crescimento bacteriano, assim como a produção dos ácidos causadores da desmineralização dental. Esse estudo avaliou adesivos comerciais que contem agentes antibacterianos, analisando a resistência e morfologia da união à dentina e a atividade antimicrobiana desses materiais odontológicos.

No ensaio de microtração, o tempo de armazenamento por um ano em saliva artificial não reduziu a resistência de união à dentina, portanto sem diferença estatística quando se comparou os valores médios obtidos pelos adesivos logo após a confecção das “restaurações” e os valores após um ano. Os adesivos Peak Universal Bond e o Gluma 2Bond não apresentaram diferença estatísticas entre si e o Peak Universal Bond teve uma maior resistência de união comparado ao Clearfil SE Protect. Os adesivos autocondicionantes tendem a ter

um valor de resistência de união mais baixo comparado aos adesivos convencionais, uma vez que o condicionamento com ácido fosfórico promove uma maior desmineralização comparado aos monômeros ácidos presentes nos adesivos autocondicionantes. O condicionamento ácido remove completamente a lama dentinária e os *smear plugs,* expondo as fibrilas colágenas, que depois entram em contato com os monômeros adesivos pela infiltração do agente de união na dentina desmineralizada. Para os adesivos autocondicionantes, o *primer* pode remover totalmente ou apenas modificar a lama dentinária, com formação de uma fina camada híbrida pela parcial desmineralização da superfície da dentina e infiltração monomérica, especialmente para os adesivos autocondicionantes com pH próximo de 2 (Reis *et al.,* 2005). Outros estudos também demonstraram valores de resistência de união inferiores para o Clearfil SE Protect, quando comparado com sistemas adesivos convencionais (Shinohara *et al.,* 2009; Sarr *et al.,* 2010; Reis *et al.,* 2010).

Até vinte anos atrás, era comum a redução da resistência de união em curto período de tempo para os adesivos utilizados naquela época. Daquele tempo até os dias atuais, muita coisa mudou na composição e nas técnicas dos procedimentos adesivos, sendo esses materiais intensamente utilizados em Dentística Operatória, Prótese e Odontopediatria. Este estudo mostrou que as médias de resistência de união à dentina dos adesivos estudados não tiveram redução após 1 ano. Não se sabe até que ponto os agentes antimicrobianos podem interferir neste processo, entretanto seus efeitos separadamente tem se mostrado promissores. Carrilho *et al.* (2007) mostrou que a aplicação de

clorexidina (neste estudo presente na formulação do adesivo Peak Universal Bond) preserva a resistência de união e as propriedades morfológicas da dentina, evitando a degradação precoce da camada híbrida. O adesivo Peak Universal Bond testado apresenta 0,2% de clorexidina numa solução alcoólica que contém 2-hidroxietil metacrilato e ácido metacrílico.

Segundo Stawarczyk *et al.* (2011), o Gluma Desensitizer, que também contém glutaraldeído em sua composição, reduz a permeabilidade dentinária e ao mesmo tempo desinfeta a dentina. A aplicação do Gluma Desensitizer na dentina condicionada com ácido fosfórico tem melhorado a eficácia dos agentes de união de acordo com Ritter *et al.* (2001). Os autores relataram que o aumento na resistência de união poderia estar relacionada às ligações covalentes cruzadas entre o colágeno e o glutaraldeído. O bom resultado obtido com o adesivo Gluma 2Bond pode estar relacionado com sua composição, que apresenta o glutaraldeído numa solução alcoólica e um monômero adesivo funcional 4-META, o qual estabelece união química com o cálcio da dentina (Nakabayashi *et al.,* 1992, Van Landuyt *et al.,* 2007). Assim, é possível estabelecer união às duas partes constituintes da dentina, orgânica e mineral.

As ligações covalentes com o colágeno tipo I ocorrem por eliminação dos grupos amino da lisina e hidroxilisina residuais das diferentes cadeias polipepitídicas do colágeno por ligações cruzadas monoméricas ou oligoméricas. Tem sido demonstrado também que a aplicação de agentes de ligações cruzadas exógenos ajuda a modificar a estrutura das fibrilas colágenas, e melhora a

resistência à degradação, assim como a sua estabilização físico-química. O glutaraldeído é considerado um agente de ligação cruzada (Fang *et al.,* 2012).

Segundo Pashley *et al.* (2011), a adição do monômero MDPB ao sistema adesivo promove também atividade terapêutica, eliminando as bactérias residuais na dentina infectada pela cárie, e tem a propriedade de inibir metoloproteinases (MMPs) endógenas que foram ativadas pelo processo carioso ou expostas e ativadas pelo sistema autocondicionante. Em seu estudo, Donmez *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes em relação ao Clearfil SE Protect, não obtendo diferença estatística quando armazenado por 1 ano (*in vitro* e *in vivo*). A inibição das MMPs pode promover uma manutenção dos valores de resistência de união, e segundo Liu *et al.* (2011), o monômero MDPB pode apresentar vários graus de atividade anti-MMPs. Esse monômero juntamente com o 10-MDP, são os monômeros funcionais deste adesivo.

Ao se analisar a interface de união dentina-sistema adesivo, o Clearfil SE Protect, que apresentou menor resistência de união, também formou a camada híbrida mais fina entre os adesivos testados. Já o Peak Universal Bond apresentou a camada híbrida mais espessa, com grande quantidade de *tags* no interior dos túbulos dentinários resinosos. Alguns fatores colaboram para os resultados de resistência de união, principalmente à dentina, entre eles: tipos de adesivos, solventes orgânicos, variação da técnica de aplicação, condições do substrato e a qualidade da hibridização, dada pela característica de infiltração do adesivo, reação química com elementos da dentina e o grau de polimerização do

adesivo. A retenção resultante do polímero adesivo na dentina é a responsável pela resistência de união (Albaladejo *et al.,* 2010).

Essa diferença da espessura da camada híbrida tem sido relatada (Albaladejo *et al.,* 2010, Arrais & Giannini, 2002), sendo que os adesivos autocondicionantes apresentaram menor espessura da camada híbrida em relação aos sistemas adesivos convencionais. Os diferentes mecanismos de hibridização são os responsáveis por essa diferença. O monômeros ácidos dos sistemas adesivos autocondicionantes induzem a formação do complexo hibridizado, que é compreendido por uma zona superficial constituída pela hibridização da lama dentinária e, abaixo, pela verdadeira camada híbrida. Já nos sistemas adesivos convencionais, o uso do ácido fosfórico por 15 segundos remove a lama dentinária e desmineraliza a dentina numa profundidade de ate 10 micrometros. Nesta técnica, o passo seguinte é a aplicação de um *primer* e um agente adesivo mais hidrófobo, gerando uma dentina infiltrada pelos monômeros adesivos (Albaladejo *et al.,* 2010).

Em relação ao padrão de fratura, o adesivo Gluma 2Bond apresentou predominância de fratura do tipo I e do tipo VI em 24 horas de armazenamento e tipo I, II e III quando armazenado por 1 ano. O Gluma 2Bond foi o adesivo que apresentou uma maior quantidade de padrão de fratura do tipo VI. Apesar da predominância ter passado do padrão VI para os padrões II e III, ambos são padrões localizados na interface adesiva (entre dentina, sistema adesivo e resina). Foi observado a redução da falha coesiva em resina após 1 ano. Esse adesivo,

que é utilizado com condicionamento ácido, resultou num complexo e variado modo de fratura.

O adesivo Clearfil SE Protect apresentou predominância de falhas do tipo III e tipo IV após 24 horas de armazenamento. Ambas as falhas se mantiveram predominantes após 1 ano de armazenamento. Porém, a falha do tipo I que antes não foi detectada, após 1 ano está presente. A grande quantidade de falhas do tipo III indica que a região mais fraca da interface resina-dentina foi justamente na área de união, visto a baixa interação adesivo-dentina observada nas imagens de MEV. Esse resultado também complementa aquele encontrado na resistência de união, em que o Clearfil SE Protect apresentou menor resistência de união comparado aos outros dois sistemas adesivos. Concordando com este estudo, Sarr *et al.* (2010) e Donmez *et al.* (2005) também encontraram uma predominância de falhas na interface adesiva e falhas mistas para o adesivo Clearfil SE Protect.

O adesivo Peak Universal Bond apresentou predominância de falhas do tipo I e do tipo IV após 24 horas de armazenamento. Ambas as falhas se mantiveram predominantes após 1 ano de armazenamento. Porém, houve um pequeno aumento da falha na união dentina-adesivo (tipo III). Esse adesivo foi o que apresentou uma maior quantidade de falha coesiva em dentina (tipo VII). A falha do tipo I estava constantemente presente na falha mista. Esse adesivo também não apresentou ampla variação do padrão de fratura.

O adesivo Gluma 2Bond não apresentou halo de inibição para as bactérias facultativas, tanto polimerizado quanto não polimerizado. A presença de halo de inibição pode ser um indicativo de potencial antimicrobiano. Porém, quando não

há a presença desse halo, sugere-se que há falta de difusibilidade do adesivo/substância através do meio de cultura. A presença do halo de inibição depende da toxicidade do material utilizado contra a bactéria testada, e da difusibilidade do material pelo meio de cultura utilizado. Um material que se difunde mais facilmente provavelmente apresentará maiores halos de inibição (Fraga *et al.,* 1996).

Apesar desse adesivo não apresentar halo de inibição para as bactérias facultativas ele foi bactericida após 24 horas de contato com o inóculo, o que indica um potencial antibacteriano. O seu grupo controle negativo (Gluma Comfort Bond) não apresentou halo de inibição mas também foi bactericida 24 horas após o contato com o inóculo. Seu grupo controle positivo (Glutaraldeído 5%) apresentou halo de inibição e foi bactericida em todos os tempos testados para todas as bactérias facultativas. O efeito bactericida após 24 horas de contato com o inóculo do Gluma 2Bond pode não ser devido à presença de glutaraldeído, mas devido a algum componente monomérico presente tanto no Gluma 2Bond quanto no Gluma Comfort Bond.

Walter *et al.* (2007) avaliou a atividade antibacteriana entre o Gluma Comfort Bond + Desensitizer (com glutaraldeído) e o Gluma Comfort Bond. O efeito bactericida entre eles também foi equivalente. Segundo Walter *et al.* (2007) a pequena diferença na atividade bactericida entre esses dois produtos sugere que o glutaraldeído, que é conhecido por ser um agente desinfetante, pode exibir um efeito antibacteriano transitório ou o seu efeito pode ser suprimido por outro componente após a polimerização e envelhecimento.

O Clearfil SE Protect apresentou halos de inibição para todas as bactérias, tanto polimerizado ou não, assim como o seu *primer* testado separadamente (também polimerizado ou não). Para a maioria das bactérias não houve diferença estatística entre elas, apenas para o *Streptococcus mutans,* no qual o adesivo Clearfil SE Protect polimerizado apresentou menor valor. Ou seja, mesmo após polimerizado o adesivo continuou tendo atividade antimicrobiana semelhante quando não polimerizado. O seu grupo controle Clearfil SE Bond apresentou menor tamanho de halo de inibição somente para o *Enterococcus faecalis.* Porém, para as outras bactérias não houve diferença estatística.

O *primer* isolado também foi bactericida para todas as bactérias testadas, enquanto que o Clearfil SE Protect não foi bactericida em nenhum dos tempos testados somente para a bactéria *Enterococcus faecalis*. Já o seu controle negativo (Clearfil SE Bond) não foi bactericida para nenhuma da bactérias em nenhum tempo testado.

Imazato et al. (2006) também observou a atividade antibacteriana do *primer* do Clearfil SE Protect. Apesar da metodologia de halo de inibição apresentar algumas diferenças (utilização de 20 µL do *primer* em discos de papel) do presente estudo, Imazato também encontrou halos de inibição do *primer* para as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei.* Além dessas duas bactérias também foi obtido halo de inibição para a bactéria *Actinomyces naeslundii.* Porém, nesse estudo não foi observado a presença de halos para o *primer* sem MDPB, mas com MDP, para as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei.*

Esteves *et al.* (2010) avaliou a atividade antibacteriana de vários adesivos autocondicionantes. Tanto o Clearfil SE Protect como o Clearfil SE Bond apresentaram halo de inibição para as seguintes bactérias: *Streptococcus oralis* (p12,6.2), *Streptococcus cricetus* (ATCC 19642), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478). No mesmo estudo o Clearfil SE Protect apresentou maior halo de inibição, com diferença estatística, que o Clearfil SE Bond para as bactérias *S. cricetus, S. mutans e S. sobrinus.*

O monômero MDPB tem mostrado uma ampla atividade inibitória e bactericida contra várias bactérias. Imazato (2009), em sua revisão de literatura sobre o MDPB, relatou o efeito inibitório desse monômero para as *Actinomyces*, os *Lactobacillus*, e as bactérias anaeróbias. Seu efeito bactericida foi encontrado para várias bactérias relacionadas à cárie dental, entre elas: *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* (SL-1), *Streptococcus sanguinis* (NCTC7863), *Streptococcus salivarius* (NCTC8618), *Lactobacillus plantarum* (ATCC14917), *Lactobacillus fermentum* (ATCC14931), *Propionibacterium acnes* (ATCC6919), *Bifidobacterium bifidum* (ATCC29521) e *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (ATCC14963).

O adesivo Peak Universal Bond apresentou halo de inibição, mas não foi bactericida para nenhuma bactéria facultativa em nenhum dos tempos testados. Na metodologia de halo de inibição o adesivo apresentou halo de inibição para todas as bactérias quando não polimerizado. Quando polimerizado apresentou halos somente para as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. Para

essas bactérias não houve diferença estatística entre o Peak Universal Bond polimerizado ou não. O seu controle negativo não apresentou halo de inibição e também não foi bactericida. Já seu controle positivo (digluconato de clorexidina 0,2%) apresentou halo para todas as bactérias e foi bactericida para todos os tempos testados. Esse resultado sugere que a clorexidina, presente no adesivo, não tem atividade antibacteriana, talvez pelo aprisionamento da substância na rede polimérica, quando o mesmo é polimerizado, e por esse fato não entra em contato com a bactéria.

Hiraishi *et al.* (2010) incorporou diferentes concentrações de clorexidina (1% e 2%) ao *primer* de um cimento resinoso e, para a metodologia de halo de inibição, quanto maior a concentração de clorexidina, maior era o halo formado. O mesmo resultado foi obtido para os grupos controles utilizados no presente estudo, em que os halos produzidos pelo digluconato de clorexidina 2% foram maior que os halos produzidos pelo digluconato de clorexidina 0,2%. Sugere-se, portanto, a incorporação de uma porcentagem maior de clorexidina ao adesivo Peak Universal Bond na tentativa de melhorar as propriedades antibacterianas desejadas. Talvez, com a adição de uma concentração maior, a clorexidina possa apresentar alguma atividade bactericida, e produzir uma melhor eficácia na desinfecção da cavidade. Porém, não se sabe se esse aumento na concentração pode interferir em outras propriedades desse adesivo.

Novos estudos ainda são necessários para verificar qual é tempo de duração da ação dos agentes antimicrobianos presente nos sistemas adesivos estudados e que apresentaram efeito bactericida após polimerizados. É importante

também a avaliação do efeito dos adesivos quando utilizados em biofilmes e não apenas em bactérias isoladas.

7. CONCLUSÃO

Para cada metodologia nesse estudo podemos concluir que:

1. Os adesivos contendo agentes antimicrobianos não apresentaram redução na resistência de união após um ano de armazenamento em saliva artificial;
2. Todos os adesivos formaram as duas estruturas básicas (camada híbrida e tags de resina) que representam o mecanismo atual de união dos sistemas adesivos à dentina. O sistema autocondicionante apresentou a camada híbrida com menor espessura e com menor quantidade de tags de resina no interior dos túbulos dentinários.
3. Os adesivos e parte de seus componentes que apresentaram halo de inibição (*Primer* do Clearfil SE Protect, Clearfil SE Protect, Peak Universal Bond) possuem potencial inibitório do crescimento bacteriano, polimerizados ou não, para todas as bactérias;
4. Os adesivos Gluma 2Bond, *Primer* do Clearfil SE Protect e o Clearfil SE Protect polimerizados possuem potencial bactericida. Apenas o adesivo Peak Universal Bond não apresentou potencial bactericida.

REFERÊNCIAS*

Albaladejo A, Osorio R, Toledano M, Ferrari M. Hybrid layers of etch-and-rinse versus self-etching adhesive systems. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(1):112-8.

Arrais CA, Giannini M. Morphology and thickness of the diffusion of resin through demineralized or unconditioned dentinal matrix. Pesqui Odontol Bras. 2002;16(2):115-20.

Arrais CAG, Chan DCN, Giannini M. Effects of desensitizing agents on dentinal tubule occlusion. J Appl Oral Sci. 2004;12(2):144-8.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Aust Dent J. 2007;52(1 Suppl).

Bertolotti RL. Total-etch – The rational dentin bonding protocol. J Esthet Dent. 1991;3(1):1-6.

Bowen WH, Pearson SK. The effects of sucralose, xylitol, and sorbitol on remineralization of caries lesions in rats. J Dent Res. 1992;71(5):1166-8.

Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. J Adhes Dent. 2009;11(3):191-98.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. Dent Mater. 2010;26(4):320-5.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res. 1995:34(6):849-53.

Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorexidine. J Dent Res. 2007;86(6):529-33.

Carvalho AO, Oliveira MT, Nikaido T, Tagami J, Giannini M. Effect of adhesive system and application strategy on reduction of dentin permeability. Braz. Oral Res. 2012; 26(5):397-403.

Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerization contraction: the influence of stress development versus stress relief. Oper Dent. 1996;21(1):17-24.

Cantanhede de Sá RB, Carvalho AO, Puppin-Rontani RM, Ambrosano GMB, Nikaido T, Tagami J, Giannini M. Effects of water storage on bond strength and dentin sealing ability promoted by adhesive systems. J Adhes Dent. 2012. Doi: 10.3290/j.jad.a27825.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. J Dent Res. 2005;84(2):118-32.

Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural Correlates of in vivo/in vitro Bond Degradation in Self-etch Adhesives. J Dent Res. 2005;84(4):355-9.

Erratum in: J Dent Res. 2006;85(4):384.

Emilson CG & Bergenholtz G (1993) Antibacterial activity of dentinal bonding agents Quintessence International. 1993; 24(7):511-515.

Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. Oper Dent. 2010;35(4):448-53.

Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, Chen J. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. J Dent. 2012;40(6):458-66.

Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. *In*: LEACH AS. Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL. 1986;53(11):243-50.

Felton D, Bergenholtz G, Cox CF. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following Gluma pretreatment. J Dent Res. 1989;68(3):491-5.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4):294-8.

Fontana M, Gonzales-Cabezas C. Secondary caries and restoration replacement: an unresolved problem. Compend Contin Educ Dent. 2000; 21(1):15-8.

Fraga RC, Siqueira JF Jr, de Uzeda M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. J Prosthet Dent. 1996;76(5):483-6.

Fusayama T, Kurosaki N, Iwaku M. Non pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. J Den Res. 1979;58(4):1364-70.

Fusayama T. Total etch technique and cavity isolation. J Esthet Dent. 1992;4(4):105-9.

Giannini M, Arrais CA, Vermelho PM, Reis RS, dos Santos LP, Leite ER. Effects of the solvent evaporation technique on the degree of conversion of one-bottle adhesive systems. Oper Dent. 2008;33(2):149-54.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. J Endod. 2009;35(10):1350-3.

Gorman SP, Scott EM. Uptake and media reactivity of glutaraldehyde solutions related to structure and biocidal activity. Micro- bios Lett. 1977; 5:163-9.

Gorman SP, Scott EM, and Russell AD. Antimicrobial activity, uses and mechanism of action of glutaraldehyde. J. Appl. Bacteriol. 1980; 48:161-90.

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Effect of 2% chlorhexidine on dentin microtensile bond strengths and nanoleakage of luting cements. J Dent. 2009;37(6):440-8.

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Effect of chlorhexidine incorporation into a self-etching primer on dentine bond strength of a luting cement. J Dent. 2010;38(6):496-502.

Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010;94(1):134-40.

Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. J Dent Res. 1994;73(10):1641-5.

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. J Dent Res. 1997;76(3):768-72.

Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. J Dent. 1998 Mar;26(3):267-71.

Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. Biomaterials. 1999;20(9):899-903.

Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin *primer* containning antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. J Oral Rehabil. 2001;28(4):314-9.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. Dent Mater. 2003;19:449-57.

Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. Dent Mater. 2006;22(6):527-32.

Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. Dent Mater. 2009;28(1):11-9.

Kidd EA, Toffenettei F, Mjör IA. Secondary caries. Int Dent J 1992;42(3)127- 38.

Kidd EA. Diagnosis of secondary caries. J Dent Educ. 2001;65(10):997-1000.

Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000;45(2):141-8.

Li N, Nikaido T, Takagaki T, Sadr A, Makishi P, Chen J, Tagami J. The role of functional monomers in bonding to enamel: Acid–base resistant zone and bonding performance. J Dent. 2010;38(9):722-30.

Lingström P, van Ruyven FO, van Houte J, Kent R. The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. J Dent Res. 2000;79(2):770-7.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR.

Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. J Dent Res. 2011;90(8):953-68.

McDonnell G and Denver Russel A. Antiseptics and Disinfectants: Activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. 1999;12(1):147-79.

McGucken, P. V., and W. Woodside. Studies on the mode of action of glutaraldehyde on Escherichia coli. J. Appl. Bacteriol. 1973;36:419-26.

McKenzie WT, Forgas L, Vernino AR, Parker D, Limestall JD. Comparison of a 0.12% chlorhexidine mouthrinse and an essential oil mouthrinse on oral health in institutionalized, mentally handicapped adults: one-year results. J Periodontol. 1992;63(3):187-93.

Meiers JC, Miller GA. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, polyacid-modified composite resins. Oper Dent. 1996;21(6):257-64.

Meira JB, Braga RR, de Carvalho AC, Rodrigues FP, Xavier TA, Ballester RY. Influence of local factors on composite shrinkage stress development--a finite element analysis. J Adhes Dent. 2007;9(6):499-503.

Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. Aust Endod J. 2009;35(3):131-9.

Munksgaard EC and Asmussen E. Bond strength between dentin and restorative resins mediated by mixtures of HEMA and glutaraldehyde. J Dent Res. 1984; 63(8):1087-89.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res. 1982;16(3):265-73.

Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. J Esthet Dent. 1991;3(4):133-8.

Nakabayashi N, Watanabe A, Gendusa NJ. Dentin adhesion of "modified" 4-META/MMA-TBB resin: function of HEMA. Dent Mater. 1992;8(4):259-64.

Napimoga MH, de Oliveira R, Reis AF, Gonçalves RB, Giannini M. In vitro antimicrobial activity of peroxide-based bleaching agents. Quintessence Int. 2007;38(6):329-33.

Pannuti CM, Saraiva MC, Ferraro A, Falsi D, Cai S, Lotufo RF. Efficacy of a 0.5% chlorhexidine gel on the control of gingivitis in Brazilian mentally handicapped patients. Clin Periodontol. 2003;30(6):573-6.

Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to Increase the Durability of Resin-Dentin Bonds. Compend Contin Educ Dent. 2011;32(7):60-4, 66.

Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ Jr. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. Am J Dent. 1994;7(2):81-4.

Pinto CF, Leme AF, Ambrosano GM, Giannini M. Effect of a fluoride- and bromide-containing adhesive system on enamel around composite restorations under high cariogenic challenge in situ. J Adhes Dent. 2009;11(4):293-7.

Pinto CF, Paes-Leme AF, Ambrosano GM, Giannini M. In vitro secondary caries inhibition by adhesive systems in enamel around composite restorations. Oper Dent. 2010;35(3):345-52.

Reis A, Grandi V, Carlotto L, Bortoli G, Patzlaff R, Accorinte MLR, Loguercio AD. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. J Dent. 2005; 33(7)549-59.

Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. Dent Mater. 2007;23(9):1164-72.

Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;85(1):10-7.

Reis AF, Carrilho MR, Ghaname E, Pereira PN, Giannini M, Nikaido T, Tagami J. Effects of water-storage on the physical and ultramorphological features of adhesives and primer/adhesive mixtures. Dent Mater J. 2010;29(6):697-705.

Ritter AV, Swift Jr EJ, Yamauchi M. Effects of phosphoric acid and glutaraldehyde-HEMA on dentin collagen. European Journal of Oral Science 2001;109(5):348-53.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciuchhi B, Carvalho RM, *et al*. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – evaluation of a microtensile bond test. Dent Mater. 1994;10(4):236-40.

Sarr M, Kane AW, Vreven J, Mine A, Van Landuyt KL, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B, De Munck J. Microtensile Bond Strength and Interfacial Characterization of 11 Contemporary Adhesives Bonded to Bur-cut Dentin. Oper Dent. 2010; 35(1): 94-104.

Schüpbach P, Lutz F, Finger WJ. Closing of dentinal tubules by Gluma desensitizer. Eur J Oral Sci. 1997;105(5):414-21.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J. 2006;39(11):878-85.

Shinohara MS, Yamauti M, Inoue G, Nikaido T, Tagami J, Giannini M, de Goes MF. Evaluation of antibacterial and fluoride-releasing adhesive system on dentin-microtensile bond strength and acid-base challenge. Dent Mater J. 2006;25(3):545-52.

Shinohara MS, De Goes MF, Schneider LF, Ferracane JL, Pereira PN, Di Hipólito V, Nikaido T. Fluoride-containing adhesive: Durability on dentin bonding. Dent Mater. 2009;25(11):1383-91.

Shono Y, Ogawa T, Terashita M, Carvalho RM, Pashley EL, Pashley DH. Regional measurement of resin-dentin bonding as an array. J Dent Res. 1999;78(2):699-705.

Stawarczyk B, Hartmann R, Hartmann L, Roos M, Ozcan M, Sailer I, Hämmerle

CH. The Effect of Dentin Desensitizer on Shear Bond Strength of Conventional and Self-adhesive Resin Luting Cements After Aging. Oper Dent. 2011; 36(5):492-501.

Swift EJ Jr, Wilder AD Jr, May KN Jr, Waddell SL. Shear bond strengths of one bottle dentin adhesives using multiple applications. Oper Dent. 1997;22(5):194-99.

Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a review. FDI Commission Project 1-97. Int Dent J. 2000;50(1):1-12.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. Biomaterials. 2007; 28(26):3757-85.

Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. J Dent. 1998;26(1):1-20.

Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. Oper Dent. 2003;28(5):647-60.

Walter R, Duarte WR, Pereira PNR, Heymann, HO, Swift Jr EJ, Arnold RR. In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. Oper Dent. 2007; 32(4): 388-93.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Estudo da resistência da união dentina-resina e da atividade antimicrobiana de sistemas adesivos"**, protocolo nº 139/2010, dos pesquisadores Carolina Bosso André, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Marcelo Giannini, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/01/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Evaluation of resin-dentin bond strenght and antimicrobial activity of adhesive systems"**, register number 139/2010, of Carolina Bosso André, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Marcelo Giannini, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 01/10/2011.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

Anexo 1. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP.

Anexo 2. Análise de Variância para Resistência de União.

Tabela 11. Análise de Variância para os valores de Resistência de União.

Fatores	Valor de p
Adesivos	0,0019
Tempo de Armazenamento	0,9715
Interação entre os Fatores	0,7505